U N I V E R S I T E P A R I S - S U D

UNITE D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE DES SCIENCES
PHARMACEUTIQUES ET BIOLOGIQUES
-=-

ANNEE 1972-1973

Série E n°3

T H E S E

présentée

A L'UNITE D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE
DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES ET BIOLOGIQUES
de l'UNIVERSITE PARIS-SUD

pour l'obtention du grade de

DOCTEUR EN PHARMACIE

(Diplôme d'Etat)

par

Jean-Jacques B U N E A U X

Titre de la Thèse

ACTION DE LA STH SUR LA CAPTATION DES SUCRES PAR LE DIAPHRAGME ISOLE DE RAT HYPOPHYSECTOMISE. ROLE DE L'AMPc.

soutenue le 17 mai 1973

JURY : MM. Y. RAOUL Président
Y. FONTAINE
J.C. GOUNELLE } Examinateurs
R. MICHEL

U N I V E R S I T E P A R I S - S U D

UNITE D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE DES SCIENCES
PHARMACEUTIQUES ET BIOLOGIQUES

-=-

ANNEE 1972-1973 Série E n°3

T H E S E

présentée

A L'UNITE D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE
DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES ET BIOLOGIQUES
de l'UNIVERSITE PARIS-SUD

pour l'obtention du grade de

DOCTEUR EN PHARMACIE

(Diplôme d'Etat)

par

Jean-Jacques B U N E A U X

Titre de la Thèse

ACTION DE LA STH SUR LA CAPTATION DES SUCRES PAR LE DIAPHRAGME ISOLE DE RAT HYPOPHYSECTOMISE. ROLE DE L'AMPc.

soutenue le 17 mai 1973

JURY : MM. Y. RAOUL Président
Y. FONTAINE
J.C. GOUNELLE } Examinateurs
R. MICHEL

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

A mon épouse

A mes enfants

A ma famille

A mes amis

A Monsieur le Professeur Y.RAOUL,

Professeur de Physiologie et Anatomie humaine
à la Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques
de l'Université René Descartes,

Qui m'a fait le double honneur de m'accueillir parmi ses élèves et d'avoir accepté la présidence de cette thèse pour laquelle ses conseils et encouragements constants m'ont été d'un grand secours.

Qu'il veuille bien trouver ici un témoignage de ma respectueuse reconnaissance et de mon attachement profond

A Monsieur le Professeur J.C.GOUNELLE,

Professeur de Physiologie et Anatomine humaine
à la Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques
de l'Université Paris-Sud,

Qui m'a dirigé dans mes recherches et dont la compétence m'a permis de mener à bien ce travail.

En témoignage de ma profonde gratitude.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548021_0029

A Monsieur le Professeur R.MICHEL,

Professeur d'Endocrinologie
à la Faculté des Sciences Pharmaceutiques
de l'Université René Descartes,

En témoignage de ma vive reconnaissance et de ma gratitude
de bien vouloir s'intéresser à ce travail et accepter
de le juger.

A Monsieur le Professeur Y.A.FONTAINE,

Professeur au Museum d'Histoire Naturelle,

Qui a accepté de juger ce travail.

A Monsieur le Professeur P.FABIANI,

Pharmacien-Chef de l'Hôtel-Dieu de Paris,

mon Maître d'Internat,

Qui m'a toujours montré des marques d'intérêt

Qu'il veuille trouver ici le témoignage de mon respectueux attachement.

Je remercie mes amis, techniciens, chercheurs, et enseignants des laboratoires de Physiologie et de Pharmacodynamie qui m'ont toujours aidé avec complaisance.

J'adresse également mes vifs remerciements à Mademoiselle F.FRIEDRICH qui a aidé à la mise au point de certains dosages,

à Madame P.DUVERNOY pour sa collaboration.

P L A N

1ère P A R T I E

CHAPITRE I

Introduction 5

CHAPITRE II

METHODES et MATERIEL 18

A/ Captation des sucres 20

Principe 20

Technique 21

Mécanismes de transport des sucres 23

Facteurs influençant la captation des sucres 23

B/ Dosage de l'AMPc selon la technique de BROOKER et coll. (1968) 25

C/ Appréciation de la formation de l'AMPc selon la technique de KUO (1969) 34

D/ Mesure de l'acide lactique produit par les diaphragmes dans le bain d'incubation 41

E/ Mesure du CO_2 42

F/ Mesure du flux sortant de ^{14}C 42

G/ Dosage du glycogène 43

Présentation générale des tableaux 45

2ème P A R T I E

ACTION DE COURTE DUREE DE LA STH :

PHASE A " INSULIN-LIKE "

CHAPITRE III

Action de la STH sur la captation des sucres et la formation de l'AMPc 47

CHAPITRE IV

Action de la STH sur le métabolisme du glucose .. 62

CHAPITRE V

Action en temps court de l'AMPc et du dibutyryl AMPc sur la captation des sucres et le métabolisme du glucose par le diaphragme isolé de rat hypophysectomisé 69

CHAPITRE VI

Action du méthyl 2 imidazole (M2I) 80

CHAPITRE VII

Action de la TSH et de l'ACTH sur la captation du glucose 91

DISCUSSION GENERALE DE LA PHASE A 94

3ème PARTIE

ACTION DE LONGUE DUREE DE LA STH

PHASE B "DIABETOGENE"

CHAPITRE VIII

Action de la STH sur la captation des sucres après 3 et 6 heures d'incubation 97

CHAPITRE IX

Action de l'AMPc et du dibutyryl AMPc après 3 et 6 heures d'incubation 112

CHAPITRE X

Action des inhibiteurs de la synthèse protéique sur la captation des sucres provoquée par le STH, l'AMPc ou le dibutyryl AMPc 120

4ème PARTIE

CHAPITRE XI

Action de la STH, du glucagon et de l'insuline sur la formation de l'AMPc et la captation des sucres 131

5ème P A R T I E

ACTION DE DIFFERENTS IONS SUR LES EFFETS DE LA STH

CHAPITRE XII

Action du calcium sur la captation des sucres et la formation de l'AMPc 146

CHAPITRE XIII

Action de complexants du calcium sur la captation des sucres et la formation de l'AMPc 159

CONCLUSIONS GENERALES SUR L'ACTION DU CALCIUM 168

CHAPITRE XIV

Action du magnésium sur la captation des sucres et la formation de l'AMPc 170

DISCUSSION sur les différences d'actions entre le calcium et le magnésium 180

CHAPITRE XV

Action du potassium sur la captation des sucres et la formation de l'AMPc 184

CONCLUSIONS ET DISCUSSION GENERALES 193

BIBLIOGRAPHIE 198

C H A P I T R E I

INTRODUCTION

L'hormone somatotrope a de nombreux points d'action et agit par exemple sur :

- l'os, avec prolifération du cartilage épiphysaire,
- la lactation: elle est nécessaire à l'action de la prolactine,
- le métabolisme hydrominéral avec rétention du potassium et des phosphates,
- l'anabolisme des protéines et le catabolisme des lipides.

A côté de ces actions, l'hormone somatotrope (STH ou GH) a des relations importantes avec le métabolisme glucidique.

Dès 1930, HOUSSAY et BIASOTTI observent que l'hypophysectomie améliore le diabète, puis HOUSSAY et RODRIGUEZ (1953) montrent que l'administration massive et prolongée de STH provoque un diabète. A côté de ces observations "à long terme", divers auteurs remarquent que la STH provoque un effet biphasique sur la courbe de la glycémie. Chez l'homme normal ou chez le nain hypophysaire, durant la première heure suivant l'injection de l'hormone, une hypoglycémie et une chute des acides gras libres apparaissent généralement : c'est la première phase. Environ quatre heures après l'injection,

la glycémie redevient normale et peut être même légèrement augmentée tandis que les acides gras libres augmentent de façon plus ou moins importante dans le plasma. Durant cette période une nouvelle injection de STH ne produit pas d'hypoglycémie. Il ne s'agit donc pas d'une perte d'activité de l'hormone mais bien d'une nouvelle action durant cette seconde phase (DOMINGUEZ et coll. 1960 - ELSAIR,1963-1970 - DAUGHADAY et KIPNIS,1966 - ELSAIR et ROYER,1969).

Nous voyons que l'action de la STH peut être divisée en deux phases : durant la première, appelée "Insulin like" par GOODMAN (1965a) que nous appellerons "phase A", la STH semble agir comme l'insuline. Durant la deuxième phase que nous appellerons "phase B" l'activité de la STH disparaît ou s'inverse.

Mentionnons ici une période très courte précédant la phase A. Pour la captation des acides aminés ou des sucres par le diaphragme (HJALMARSON et coll.,1969) ou par le tissu adipeux, la STH présente une période réfractaire pendant laquelle aucun effet ne peut être noté. L'augmentation de la production de CO_2 ne commence que 20 minutes après le début de l'incubation du tissu en présence de STH (RILLEMA et KOSTYO,1971 - HJALMARSON,1968a - GOODMAN,1965a).

Après cette courte période réfractaire se déroule la phase "Insulin-like" de la STH qui dure environ 1 heure alors que l'insuline continue de provoquer une captation accrue du D xylose pendant plus de 6 heures. La durée d'action de l'insuline varie cependant selon le muscle étudié : elle perd plus vite son action sur le diaphragme que sur le "levator ani" (ARVILL et AHREN, 1967 - ARVILL et HJALMARSON,1967).

Les principales caractéristiques de la phase A sont :

- l'augmentation de la perméabilité des cellules de divers muscles aux sucres et aux acides aminés que ces composés soient ou non métabolisables par la cellule,

- l'augmentation du glycogène dans le diaphragme (OTTAWAY,1951 - GOODMAN,1967b) mais non dans le tissu adipeux de rat hypophysectomisé (GOODMAN,1965a),
- l'augmentation du CO_2 produit par les cellules (GOODMAN,1965a),
- l'augmentation de la lipolyse, ou plutôt une sensibilisation du tissu adipeux, par la STH, à l'action lipolytique de la théophylline et de certaines hormones comme l'adrénaline ou l'ACTH (FAIN,1968 - MOSKOWITZ et FAIN,1970).

Ces actions s'observent invitro pour des concentrations de 0,1 à 100µg/ml et après injections intraveineuses ou intrapéritonéales à l'animal.

La phase B correspond à l'effet diabétogène de la STH, c'est la phase physiologiquement dominante de l'action de l'hormone. Normalement, un animal est soumis à cette action en continu ce qui explique que la phase A ne peut être bien perçue que chez des animaux hypophysectomisés ou chez des nains hypophysaires.

La phase B se caractérise essentiellement par une perte de l'action de la STH sur la captation des sucres ou des acides aminés par les cellules musculaires. Cet effet est observé, soit in vitro, soit après une injection unique de l'hormone à l'animal (intraveineuse ou intrapéritonéale). Une fois la séquence biphasique enclanchée, une nouvelle injection de STH n'est pas capable de modifier son déroulement. In vitro, un bref contact de 1 minute entre le tissu et l'hormone suffit pour provoquer les deux phases.

MECANISMES D'ACTION DE L'HORMONE DE CROISSANCE SUR LE METABOLISME GLUCIDIQUE

Quels sont les mécanismes qui furent envisagés pour expliquer ces actions successives de la STH.

Pour la phase A

- La STH agit en stimulant la sécrétion d'insuline par le pancréas (YOUNG,1968) mais l'action initiale de la STH a été observée par KURTZ et coll. (1951) in vivo chez le chien hypophysectomisé et dépancréaté et in vitro par PARK et coll. (1952) sur le diaphragme isolé de rat hypophysectomisé et dépancréaté. Ces observations, surtout celles faites in vitro, semblent exclure une augmentation de l'insuline circulante responsable de l'action de la STH sur la captation des sucres et indiquer que la STH peut agir sans l'hormone pancréatique. GOODMAN et Mac DONALD (1969) font remarquer que la STH, pourrait cependant libérer une insuline liée au tissu, hypothèse qui n'a reçu ni confirmation, ni infirmation.

Pour la phase B

- La STH a une action anti-insuline par inhibition de la captation des acides aminés nécessaires à la synthèse de l'insuline (WHITNEY et coll.,1968). Cette hypothèse est peu vraisemblable : la STH augmente l'insuline circulante (FRANKSON et coll.,1961) et cette insuline est active (CAMPBELL et RASTOGI,1967).

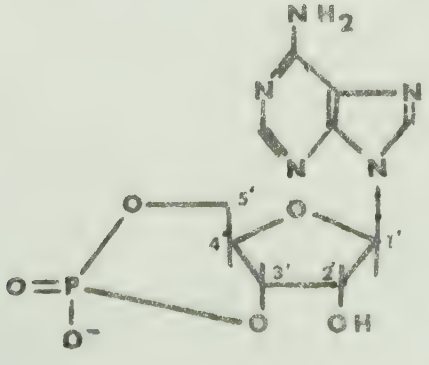
- La STH entre en compétition avec l'insuline au niveau de la captation périphérique (HJALMARSON,1968d) mais cette hypothèse ne semble pas valable parce que :

- La STH empêche par elle-même la captation et l'utilisation du glucose par les diaphragmes de rats hypophysectomisés et dépancréatés (PARK et coll.,1952).

- La STH mobilise les lipides (RANDLE,1964), lors de la phase B les acides gras libres du plasma entrent en compétition avec le glucose pour la captation mais nous avons déjà vu que la phase B de la STH se produit aussi sur un muscle isolé. L'intervention du tissu adipeux semble donc exclue.

Le mécanisme d'action de la STH doit être cellulaire et lié à certaines particularités de la cellule apparaissant lors de l'hypophysectomie. Les tissus d'animaux hypophysectomisés sont plus sensibles aux actions de la STH ou de l'insuline pour la captation des sucres que les tissus d'animaux normaux. L'hypophysectomie provoque une diminution de la captation du D glucose sans changer la vitesse de phosphorylation qui est la deuxième étape du transport du sucre. L'effet de l'hypophysectomie pourrait donc être une modification de la première étape du transport (HENDERSON et coll.,1961). RANDLE et MORGAN (1962), RIDDICK et coll. (1962) observent que le traitement chronique par la STH conduit à une dépression de la phosphorylation; la STH serait un inhibiteur de l'hexokinase.

L'intervention d'une autre hormone, d'un inhibiteur ou activateur sérique, de modifications d'autres métabolismes, ne sont pas à l'origine des deux phases de l'action de la STH sur la captation des sucres. Ces actions ont pour point de départ un effet membranaire ou intracellulaire, or en 1958, SUTHERLAND et RALL, RALL et SUTHERLAND, découvrent un médiateur intracellulaire entre certains stimuli hormonaux et leurs réponses physiologiques. Ce médiateur dans le cas de l'action hyperglycémiante de l'adrénaline est identifié à l'acide ADENOSINE 3'5'MONOPHOSPHORIQUE cyclique (AMPc).



De nombreux auteurs ont trouvé de nouvelles actions de ce composé donnant à la découverte initiale un retentissement considérable du fait de son caractère général (Tableau I), d'où l'appelation de "second messager" donnée par SUTHERLAND, soulignant ainsi son rôle fondamental dans l'action intracellulaire d'hormones très diverses.

La figure 1 schématise ce concept du second messager :

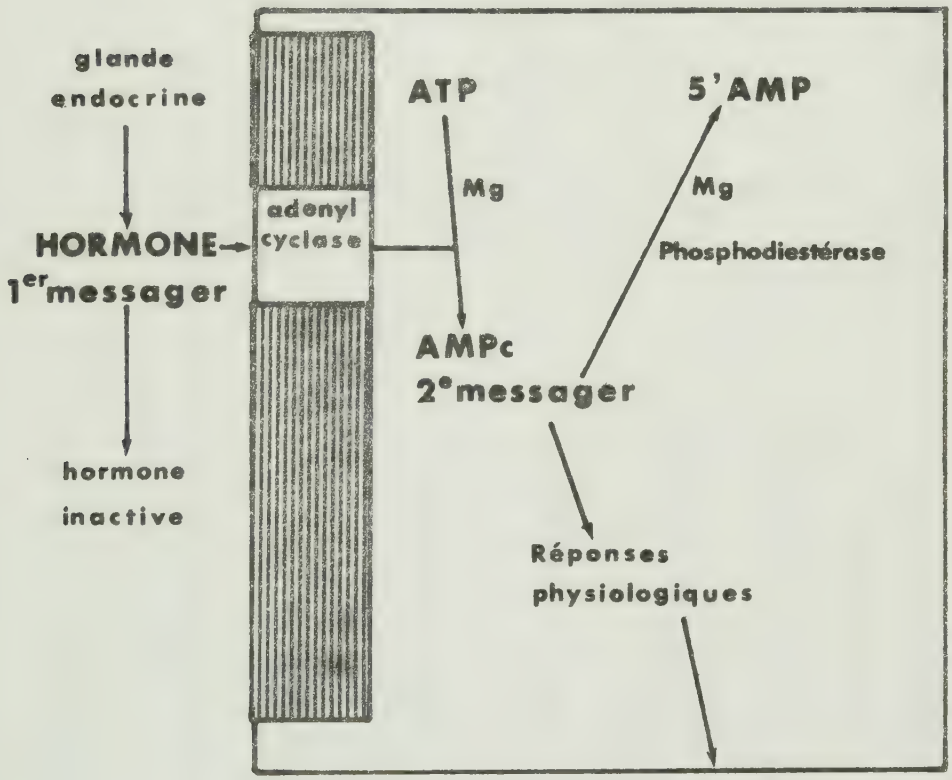


Figure 1 - Concept du second messager (selon SUTHERLAND et coll., 1968)

TABLEAU I

Principales actions hormonales mettant en jeu l'AMPc

Hormone responsable	Cellules cibles	Activité produite
Adrénaline	Muscles squelettiques	Activation de la phosphorylase
	Myocarde	"
	Muscles lisses intestin.	"
	utérus	"
	Foie	"
	Tissu adipeux	Lipolyse
Glucagon	Foie	Activation de la phosphorylase
	Tissu adipeux	Lipolyse
Vasopressine	Rein	Changement de perméabilité
	Vessie de crapaud	"
	Peau de grenouille	"
ACTH	Cortex surrénalien	Steroïdogenèse
L.H.	Corps jaune	"
TSH	Thyroïde	Synthèse des Hormones thyroïdiennes
M.S.H.	Mélanophores	Dispersion des mélanocytes
Gastrine	Estomac	Production d'acide chlorhydrique
Insuline	Tissu adipeux (diminution de l'AMPc)	?

Remarquons que la synthèse ou la sécrétion de certaines de ces hormones font intervenir l'AMPc. Sur le tableau II sont reportés : les hormones produites, la nature de l'excitation et le tissu producteur.

TABLEAU II

Hormones produites par l'intermédiaire de l'AMPc

Excitation	organes cibles	Hormone produite
glucose	Pancréas	Insuline
CRF	Antéhypophyse	A.C.T.H.
TRF	"	T.S.H.
GHRF	"	S.T.H.
TSH	Thyroïde	Hormones thyroïdiennes
électrique	neurone	Acétylcholine

La libération de la STH par l'hypophyse fut étudiée par GAGLIARDINO et MARTIN (1968), MUELLER et coll. (1968), CEHOVIC et coll. (1970a et b).

Avant d'étudier si les actions de la STH sur la captation des sucres peuvent avoir pour intermédiaire l'AMPc, examinons brièvement le métabolisme de ce nucléotide et ses relations avec les glucides.

METABOLISME DE L'AMPc

L'AMPc se forme à partir d'ATP par une réaction catalysée par l'adénylcyclase, l'ion magnésium étant nécessaire à cette transformation

$$\text{ATP} \xrightarrow[Mg^{++}]{\text{adénylcyclase}} \text{AMPc} + \text{Pyrophosphate}$$

L'enzyme se trouve dans tous les tissus, localisée dans la membrane cellulaire (SUTHERLAND et coll.,1962 - DAVOREN et SUTHERLAND,1963 - RODBELL,1967a) et dans certaines structures membranaires intracellulaires, tel le réticulum sarcoplasmique (RABINOWITZ et coll.,1965). Dans la plupart des tissus, l'adénylcyclase montre un haut degré de spécificité par rapport au stimulus hormonal (SUTHERLAND et RALL,1960), mais dans le tissu adipeux de nombreuses hormones peuvent induire la formation d'AMPc (BUTCHER, 1966, BUTCHER et coll.,1968). Les inhibiteurs β adrénergiques bloquant les effets des catécholamines sur certains tissus, ROBISON et coll. (1967), TURTLE et KNIPIS (1967a), HANDLER et coll.(1968), SMYTHIES (1972) considèrent que l'adénylcyclase est un récepteur β adrénergique.

L'AMPc est inactivé par la phosphodiestérase qui ouvre le cycle en 3' avec formation du 5'AMP. Cette enzyme est très largement répandue, elle se trouve dans la fraction soluble du cytoplasme, dans les microsomes (JOST et RICKENBERG,1971) et dans le noyau (SUTHERLAND et RALL,1969). L'acide nicotinique, l'imidazole et ses dérivés stimulent l'action de la phosphodiestérase (BUTCHER et SUTHERLAND,1962), celle-ci étant, par contre, inhibée par les méthylxanthines (et particulièrement la théophylline), l'ion citrate et le pyrophosphate (SIOUFI et coll.,1970).

RELATIONS ENTRE L'AMPc ET LES GLUCIDES

Le rôle principal de l'AMPc dans certains tissus comme le foie et le muscle est de faciliter la mobilisation du glucose. Dans le foie, après action du glucagon ou des catécholamines, l'augmentation du taux intracellulaire de l'AMPc conduit à une augmentation de la production de glucose par trois voies :

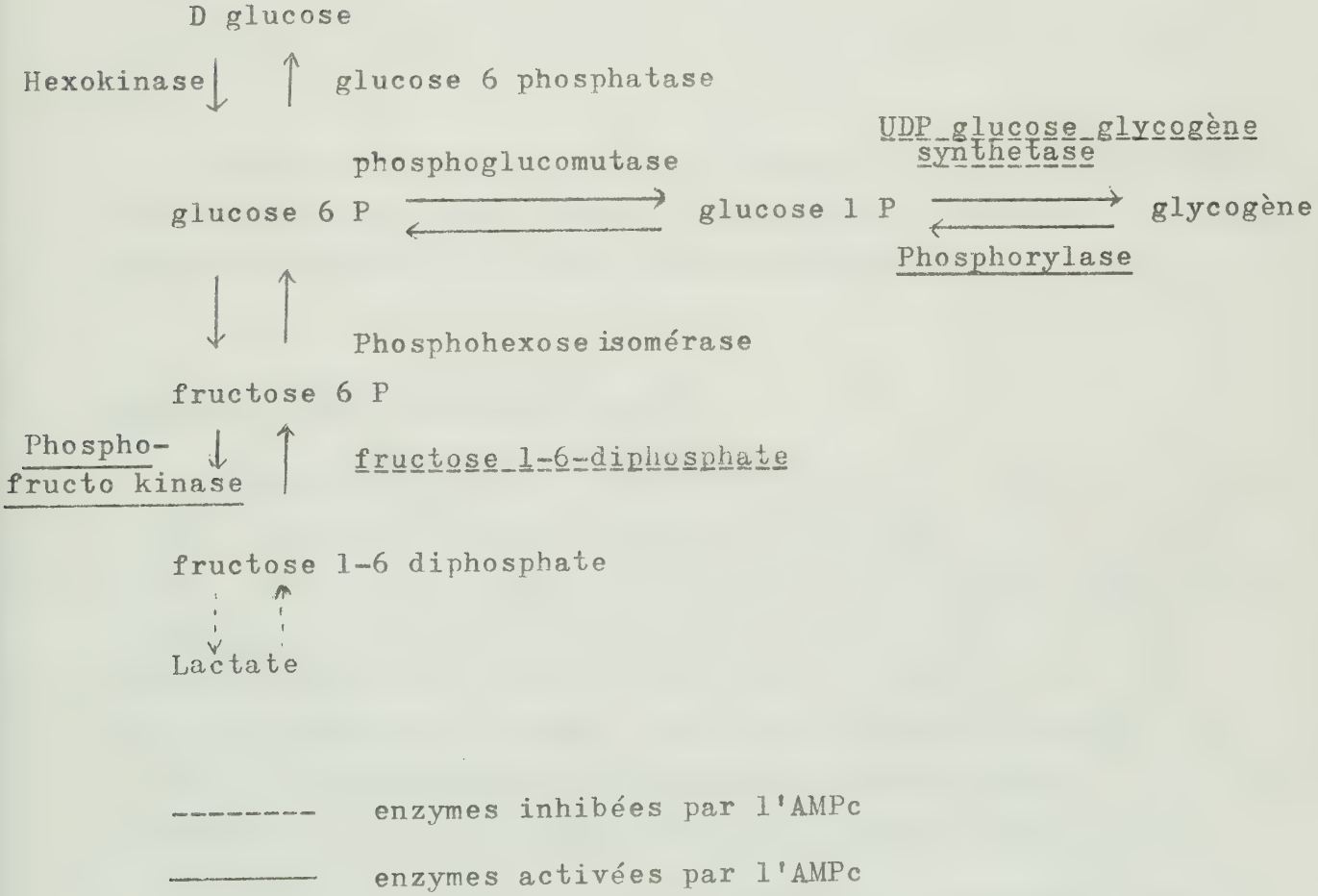
- activation de la phosphorylase
- inactivation de la glycogène synthétase
- stimulation de la néoglucogenèse à partir des lactates (GARTOFF et coll.,1972)

En outre, l'AMPc provoque une sécrétion d'insuline par les cellules β des îlots de LANGHERANS (TURTLE et coll.,1967b). Cette hormone, au niveau du foie ou du tissu adipeux, tend à diminuer le taux d'AMPc, ce qui freine l'action des catécholamines ou du glucagon.

Le tableau III montre une partie des étapes de la glycogénolyse et de la glyconéogenèse,avec les points d'impact de l'AMPc.

TABLEAU III

Glycogénolyse et glyconéogenèse



Les phosphorylases musculaires ou hépatiques sont surtout sous forme inactive (95p.100) lors des périodes de repos, leurs activations sont réalisées après diverses étapes par l'AMPc (ASSAN,1970). Le système adénylcyclasique des cellules étant différent pour chaque cellule, ces phosphorylases ne sont pas activées par les mêmes hormones : l'enzyme hépatique est sensible aux catécholamines et au glucagon, celle du muscle aux seules catécholamines.

Les phosphorylases conduisent à la formation de glucose 1 phosphate puis de glucose 6 phosphate. Dans le foie, grâce à la glucose 6 phosphatase, le sucre peut être libéré et sortir de la cellule, mais dans le muscle cette dernière enzyme manque, le glucose 6 phosphate est transformé en lactate qui,lui, peut sortir de la cellule.

L'AMPc peut activer la transformation en glucose des lactates ou pyruvates, ces corps pouvant provenir d'acides gras ou d'acides aminés glycoformateurs (BRON et ROUS,1970,1971).

RELATIONS ENTRE L'AMPc ET LA STH

Certaines actions de la STH se font par l'intermédiaire de l'AMPc, comme son action mitogénique (WHITFIELD et coll.,1971) et son action sur la lipolyse (KUO et de RENZO,1969 - MOSKOWITZ et FAIN,1970 - SWISLOCKI,1970), mais l'AMPc peut-il intervenir durant la phase A de l'action de la STH ? L'AMPc joue un rôle dans les phénomènes rapides, ses variations sont brusques sous l'effet d'une hormone et elles sont assez peu durables : ces effets ressemblent à ceux de la STH durant la phase A "Insulin-like".

Dans certains cas, l'insuline réduit le taux d'AMPc et accroît la captation du glucose (BUTCHER et coll.,1968), l'AMPc, par lui-même, provoque une captation accrue de glucose par le

diaphragme de ratte adulte (EDELMAN et EDELMAN,1966). Les actions de l'insuline et de la STH se manifestent donc par les mêmes effets c'est-à-dire une captation accrue du glucose, mais leurs mécanismes d'action peuvent être différents.

Durant la phase B, de retour à une captation normale des sucres, l'intervention de l'AMPc serait plus logique que durant la phase A. Par mobilisation du glycogène et des acides gras, le nucléotide crée un gradient de concentration qui tend à réduire le flux entrant des sucres.

Une synthèse protéique semble nécessaire pour que la phase B se déroule, les inhibiteurs de synthèse protéique ajoutés avant la STH abolissant cette seconde phase et prolongeant un certain temps l'effet initial de l'hormone (GOODMAN,1963-1965a - HJALMARSON 1967b-d - HJALMARSON et AHREN,1967a - AHREN et HJALMARSON,1968). La STH peut agir en stimulant la synthèse (et/ou l'activité) de l'adénylcylase. Les inhibiteurs de synthèse protéique en empêchant l'augmentation du nombre des sites adénylcyclasiques, prolongent la phase A.

Le premier but de notre étude, après l'exposé des méthodes et matériels utilisés (Ière partie) est de vérifier si une relation existe entre la STH et l'AMPc, tant durant la phase A (IIème partie) que durant la phase B (IIIème partie) et si l'insuline peut interférer avec ces phases (IVème partie).

Au cours de cette étude, les effets particuliers de trois ions ont retenu notre attention pour diverses raisons :

le calcium qui favorise à petites doses la fixation des hormones sur l'adénylcyclase, alors qu'à plus fortes doses, il inactive cette enzyme,

le magnésium qui est nécessaire à la transformation de l'ATP en AMPc,

le potassium qui augmente l'AMPc intracellulaire et diminue la captation des sucres.

Nous avons cherché à savoir si ces trois ions avaient une influence sur l'activité de la STH durant la phase A (Vème partie).

C H A P I T R E II

METHODES ET MATERIEL

Pour l'étude de l'action de la STH sur la captation des sucres et la mise en évidence d'une relation entre l'hormone et l'AMPc, nous avons utilisé des méthodes d'incubation *in vitro* du diaphragme isolé de rat hypophysectomisé.

Ces incubations ont été choisies pour contrôler aisément de nombreux paramètres : temps d'incubation, température, concentration en hormone et sucre, force ionique des bains ... et pour réduire les interférences dûes à d'autres hormones présentes chez l'animal entier.

Le diaphragme a été retenu. C'est le muscle qui présente le plus grand rapport surface/poids. La pénétration des sucres, le contact avec les produits testés sont plus réguliers que dans un muscle compact.

Nous avons choisi le rat hypophysectomisé qui est l'objet de nombreuses études sur ce sujet ainsi la comparaison avec d'autres auteurs a plus de signification que si nous avions utilisé une autre espèce animale.

L'hypophysectomie est une condition nécessaire à cette étude, la STH ne présentant pas ou peu son action "insulin-like" chez l'animal entier.

Trois critères doivent être vérifiés (SUTHERLAND,1968 - MOREL,1970) pour prouver qu'une hormone agit selon le schéma du "second messager" dont les différentes phases sont :

Hormone ⟶ Adenylcyclase ⟶ AMPc ⟶ Action

1) L'application de l'hormone doit provoquer une augmentation du taux intracellulaire de l'AMPc, cette augmentation précédant la réponse physiologique. La difficulté du dosage de l'AMPc, la dilution des récepteurs hormonaux au sein de l'organe cible, la rapidité de formation et de destruction de l'AMPc expliquent qu'on se contente d'une simultanéité de la réponse et de l'augmentation de l'AMPc.

2) L'addition d'AMPc exogène doit reproduire les effets biologiques de l'hormone étudiée. Ce critère est difficile à mettre en oeuvre à cause de l'imperméabilité souvent importante des membranes à ce nucléotide. Il faut employer des doses massives (par rapport au taux intracellulaire, bien entendu) pour avoir un faible effet. L'emploi du dibutyryl AMPc qui possède une meilleure pénétration permet dans une certaine mesure de vérifier ce critère.

3) L'addition de théophylline qui inhibe la phosphodiestérase,de ce fait la destruction du nucléotide,doit potentialiser les effets de doses liminaires de l'hormone et inversement l'accélération du métabolisme de l'AMPc par l'imidazole ou ses dérivés doit annuler ou réduire les effets de l'hormone.

Dans ce chapitre, nous exposons les techniques permettant la mesure de captation des sucres, les dosages d'AMPc et enfin les mesures annexes pour suivre le métabolisme du D glucose, c'est-à-dire le dosage de l'acide lactique,du CO_2 produit et du glycogène.

A/ PRINCIPE DE MESURE DE LA CAPTATION DES SUCRES

Pour apprécier un des aspects de l'action de la STH sur les sucres, nous avons pris comme test la "captation" de deux sucres :

- d'abord le D xylose, le marqueur étant du D xylose uniformément marqué au carbone radioactif (^{14}C D xylose (U)); le D xylose est un pentose ayant la même disposition spatiale que le glucose pour les quatre premiers atomes de carbone. S'il n'est que partiellement métabolisé par le foie et les tissus (COURTOIS et PERLES, 1964) son transport est le même que celui du glucose, il est employé dans le but de se soustraire au métabolisme ultérieur.
- ensuite le D glucose, le marqueur étant aussi uniformément marqué sur ses six atomes de carbone (^{14}C D glucose (U)); il est employé pour étudier dans certains cas son métabolisme après sa captation.

Ce terme de "captation" englobe le transport dont nous rapellerons les mécanismes, les transformations ultérieures possibles du sucre après son passage transmembranaire c'est-à-dire pour le D glucose sa métabolisation en lactate, en glycogène, en gaz carbonique... sont exclues de la captation.

Pour mesurer cette captation, les procédés utilisés reposent tous sur le même principe. Les tissus : cellules grasses isolées, muscles, membranes cellulaires ... sont mis à incuber selon différentes conditions dans une solution du sucre à tester. Les essais des premiers auteurs portaient sur un sucre "froid" (seule sa disparition du bain peut être mesurée). Puis ultérieurement, les sucres "marqués" furent utilisés (à la fin de la période d'incubation, la diminution de la radioactivité du bain peut être mesurée ou plus généralement le tissu est broyé ou dissout dans un liquide genre HYAMINE*, la radioactivité du broyat ou de la solution indique la captation. Seul le rejet de ^{14}C par les cellules risque de fausser la mesure de la captation.

---

* HYAMINE : Société PACKARD

Techniques de mesure de la captation

Pour ces travaux nous avons employé, avec quelques variantes, la technique décrite par HJALMARSON (1967a).

Les hémi-diaphragmes de rats hypophysectomisés (*), à jeun depuis 20 heures, sont prélevés suivant la technique de KNIPIS et CORI (1967), rapidement rincés avec du liquide de Krebs (**) tiédi à 37ºC puis mis à préincuber pendant 10 min dans 5 ml du même liquide. Après cette préincubation, les hémi-diaphragmes sont immergés dans 4 ml de la solution de Krebs contenant les produits à essayer. La solution est préalablement saturée pendant 15 secondes par du carbogène (O_2 95 p.100, CO_2 5 p.100), le liquide est contenu dans un erlenmeyer de 25 ml bouché, maintenu à 37ºC et agité continuellement.

Pour l'étude de la phase A, l'incubation dure 1 heure, le D xylose à la concentration de 75 mg/ml avec 0,2µC/ml de ^{14}C D xylose (U) (***) marqueur est ajouté au début de l'incubation. Lors de l'étude de la phase B, le sucre n'est ajouté qu'à la fin de la 2ème ou de la 5ème heure, pour réaliser des incubations de durée totale de 3 ou 6 heures.

A la fin de l'incubation, l'hémi-diaphragme est rapidement rincé par une solution de NaCl à 9‰, nettoyé des restes de côtes, sternum, muscles intercostaux,... séché entre deux papiers filtre et pesé. Après broyage dans 3 ml d'acide trichloracétique à 10 p.100 avec un appareil "ultraTurax" pendant 45 secondes et centrifugation, 0,2ml du surnageant de l'homogénat sont versés dans 18 ml du mélange scintillant suivant : POPOP : 100mg , PPO 4g Alcool absolu : 500ml , Toluène : 1000ml.

(*) Rats de 90 ± 10g hypophysectomisés par voie transauriculaire au moins 10 jours avant l'essai (fournis par IFFA CREDO).

(**) Composition du liquide de Krebs employé :
NaCl 6,6g KCl 0,35g $CaCl_2$ 0,28g KH_2PO_4 0,162g
$MgSO_4$ $7H_2O$ 0,294g $NaHCO_3$ 2,10g Albumine bovine 5g
Eau q.s. 1000ml.

(***) Fourni par Radiochemical Center Amersham

Pour le glucose, certaines variantes ont été apportées, en fait non pas pour la mesure de la captation du sucre mais pour pouvoir effectuer d'autres dosages à partir des mêmes diaphragmes. Ces modifications sont les suivantes :

- les diaphragmes sont divisés en quatre parts et non en deux,
- l'incubation a lieu dans 5ml de bain contenant le sucre à la concentration de 0,5mg/ml avec comme traceur le ^{14}C D glucos (U) d'une activité de 0,2µC/ml (son activité spécifique est de 150mC/mM) (*),
- l'homogénéisation a lieu dans de l'acide perchlorique à 0,6M. Le surnageant est neutralisé en présence de bleu de bromophénol par de la potasse 2N et complété à 10ml avec de l'eau distillée. Après centrifugation, 1 ml est versé dans 10ml de liquide de BRAY (1960) modifié composé de naphtalène 100g, PPO 6g, dimethyl POPOP 400mg, méthanol 150m dioxanne qs. 1 litre (ce liquide diffère de celui de BRAY par l'absence d'éthylène glycol). Le reste du surnageant sert au dosage de l'AMPc.

Le nombre de coups par minute (cpm) du carbone radioactif est mesuré pendant 4 minutes pour le D xylose, 2 ou 5 pour le D glucose; sur la moyenne des cpm nous calculons les cpm pour 100mg de diaphragme, puis le rapport en pourcentage de cpm/100mg pour chaque fragment par rapport à son témoin.

La réduction de la concentration du D glucose dans le bain durant l'incubation est insuffisante pour entraîner une diminution ultérieure de la captation; en une heure la réduction de la radioactivité du bain est de 3,5 p.100 environ.

(*) Fourni par le C.E.A.

Mécanisme de transport des sucres

Nous avons étudié la technique de captation des deux sucres; rappelons les mécanismes réglant cette captation. STEIN (1968) classe ces mécanismes en deux groupes distincts :

a) Un système de diffusion facilitée qui ne consomme pas d'énergie Ce système laisse entrer et sortir le glucose de la cellule et ne peut conduire à une concentration dans le milieu intracellulaire supérieure à celle du milieu extracellulaire. Le mouvement du sucre n'est donc lié qu'au gradient de concentration du sucre.

b) Le deuxième groupe comprend deux mécanismes qui ont besoin d'énergie et sont capables d'accumuler le sucre dans la cellule à un taux supérieur à celui du milieu extracellulaire.

Pour le premier de ces mécanismes, le transport est lié à la consommation d'énergie fournie par de l'ATP et du phosphoénolpyruvate. Pour le deuxième, l'énergie est d'ordre électrochimique, ainsi le transport du glucose dans l'intestin se fait par échange avec des ions sodium accumulés par la "pompe à sodium".

L'AMPc n'apparaît pas dans ces mécanismes mais il n'en est pas formellement exclu. Ainsi le nucléotide en provoquant une glycogénolyse augmente le glucose intracellulaire et joue contre le système de diffusion facilitée, le métabolisme de ce glucose conduit à la formation de phosphoénolpyruvate et d'ATP, qui eux favorisent le premier des transports actifs.

Facteurs influençant la captation des sucres

La majorité de ces facteurs furent étudiés par ILLIANO et CUATRECASAS (1971) dont nous reportons ici les résultats.

Ces facteurs sont :

- la durée d'incubation : d'abord directement proportionnelle au temps, la captation tend vers un plateau.

- la température d'incubation : la captation est nulle vers 0ºC, s'accroît avec la température pour atteindre un maximum vers 37ºC, puis décroît.

- la nature du sucre.

- la concentration du sucre. Ainsi pour le D glucose la captation croît avec la concentration jusqu'à un seuil de 5mM environ, au-delà elle ne croît plus que très faiblement; au contraire, pour le L glucose, la captation bien plus faible à concentration égale que pour le D glucose, croît régulièrement avec la concentration dans une très large zone.

- la présence dans le bain d'autres sucres : ainsi le 3-O-méthyl glucose réduit la captation du D glucose, le L glucose n'ayant que des effets négligeables (HELLMAN et coll.,1971). Le D glucose et le D xylose sont transportés suivant le même mécanisme (BATTAGLIA et RANDLE,1960 - WOOL,1960); ils réduisent mutuellement leur captation par compétition.

- l'osmolarité du milieu, en augmentant,provoque une entrée accrue des sucres (KOHN et CLAUSEN,1971).

- les cellules grasses ne transportent pas le D glucose contre un gradient de concentration, mais le diaphragme peut le faire pour le D xylose (EICHORN et HECHTER,1961).

- L'entrée de D glucose augmente avec la fréquence des cycles d'agitation (BROWN et coll.,1952).

- cette entrée augmente aussi avec la durée de la préincubation du tissu dans un milieu sans sucre (BROWN et coll.,1952 - HJALMARSON,1968a).

- la captation est plus proportionnelle à la surface du tissu en contact avec la solution qu'au poids du fragment (LIEBECQ,1962). Ce phénomène est facilement compréhensible, mais pour plus de commodité, le diaphragme étant d'épaisseur régulière, nous avons préféré ramener la captation au poids de tissu, facile à mesurer précisément, plutôt qu'à sa surface, plus difficile à évaluer.

Voici quelques paramètres pouvant faire varier la captation. Nous nous sommes attachés à maintenir les conditions physiques les plus constantes possibles entre chaque essai pour ne pas trop entacher d'erreur les résultats. Nous n'avons pas tenu compte des valeurs absolues de captation du sucre, qui, nous le voyons, peuvent être très variables, mais du rapport de captation, ramenée au même poids de tissu entre un fragment de diaphragme et son témoin provenant du même rat.

B/ DOSAGE DE L'AMPc PAR LA TECHNIQUE DE BROOKER et coll.(1968)

Par les mesures de captation des sucres, deux des trois critères pour prouver qu'une hormone agit par l'AMPc peuvent être vérifiés : c'est-à-dire que l'addition d'AMPc exogène reproduit l'effet de l'hormone et que la théophylline potentialise l'action de l'hormone. Le dernier critère à vérifier est que l'hormone provoque une augmentation du taux d'AMPc.

Les méthodes de dosage de l'AMPc sont nombreuses, nous ne citerons que celles entre lesquelles nous avons choisi nos techniques.

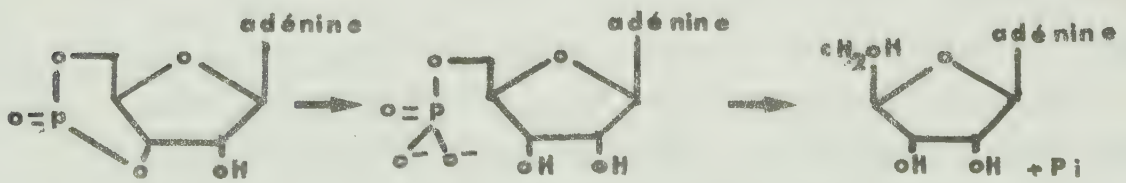
L'activation de la glycogène-phosphorylase est proposée par RALL et SUTHERLAND (1958)(1962), POSNER et coll. (1964), BUTCHER et coll. (1971), GOLDBERG et coll. (1969), la double dilution

isotopique par PAUK et REDDY (1967), la conversion en AMP et dosage de celui-ci par BRECKENRIDGE (1964), TURTLE et KNIPIS (1967), par chromatographie d'échange d'anions sous haute pression par BROOKER (1970), la mesure avec une protéine masquante par GILLMAN (1970), l'activation de la protéine kinase hépatique par CASTAGNA (1970), BUTCHER (1971), par chromatographie et lecture à 2.600Å par BRADHAM et WOOLLEY (1964), un dosage microbiologique par KONIJN (1970), la transformation de l'AMPc en ATP et appréciation de ce dernier par le couple luciférine-luciférase (PRADET,1967 - EBADI et coll.,1971 - STANLEY,1971 - JONHSON et coll.,1970). Nous en avons utilisé deux autres.

La première est une modification de la technique décrite par BROOKER et coll. (1968) qui nécessite une hydrolyse enzymatique partielle de l'AMPc suivie d'une fixation de la partie non hydrolysée par une résine échangeuse d'ion, l'hydrolyse de l'AMPc marqué au tritium sera inversement proportionnelle à la quantité d'AMPc froid provenant du matériel biologique à étudier.

Il y aura d'autant moins d'AMPc marqué au tritium hydrolysé que l'AMPc froid sera en plus grande quantité.

L'hydrolyse est produite par de la phosphodiestérase qui donne de l'AMP lui-même hydrolysé par une 5' nucléotidase provenant de venin de serpent, le schéma des réactions est le suivant :



Phosphodiestérase 5'nucléotidase
AMPc ⟶ 5'AMP ⟶ ADENOSINE

La séparation de l'AMPc et de l'adénosine permet de calculer l'AMPc présent avant l'hydrolyse.

Produits employés

- AMPc ^{3}H-8 activité spécifique 16,3 C/mM (Schwartz)
- AMPc (Sigma)
- Venin lyophylisé de serpent "Ophiophagus hanna" (Sigma)
- Résine anionique Biorad AG 1 X 2 Cl^- de 200-400 mesh de granulosité (Eurobio)

Technique

- Préparation de la résine : la résine est lavée par de la soude N, puis par de l'eau jusqu'à presque neutralité, par de l'acide chlorhydrique N et de nouveau par de l'eau jusqu'à neutralité. Elle est conservée sous l'eau à 4ºC, chaque lot doit être testé pour vérifier la quantité à utiliser.

- Préparation de la phosphodiestérase : Toute cette préparation est conduite à froid (0º à 4ºC). Un rat mâle est décapité, son cerveau prélevé, pesé, coupé en petits morceaux puis homogénéisé avec 5 fois son poids d'eau dans un broyeur de POTTER. Après centrifugation 30 minutes à 30.000g le surnageant est mélangé à parties égales avec une solution saturée de $(NH_4)_2SO_4$ et de nouveau centrifugé 10 minutes à la même vitesse. Le précipité est repris par 5 fois le poids originel du cerveau dans du tampon TRIS-HCl 60mM, mercaptoéthanol 5mM à pH8. Une dialyse de 12 heures est réalisée contre ce même tampon, en changeant deux fois de bain de dialyse. Les protéines sont dosées par la méthode de LOWRY et la solution de phosphodiestérase est répartie en petits tubes et conservée au congélateur (la conservation à -20ºC est bonne). Deux lots ont été réalisés : l'un contenant 3,75, l'autre 4,5mg de protéines par millilitre.

- Préparation du système enzymatique : Le système servant à hydrolyser l'AMPc d'abord en AMP puis en adénosine est constitué de :

Phosphodiestérase	40µg de protéine
Venin de serpent "Ophiophagus Hanna"	1 mg
Albumine bovine	2 mg
Tampon Tris HCl 60mM pH 8 2 mercaptoéthanol 5mM	q.s. 1 ml

Congelé à -20ºC ce système enzymatique est de bonne conservation. Il faut noter qu'il est préférable de diluer la phosphodiestérase préalablement, la quantité à ajouter au système enzymatique étant très faible.

- Solution radioactive d'AMPc R_1 dans un tampon TRIS HCl 60mM pH 8 contenant :

$Mg\ Cl_2$	120 mM
5'AMP	0,12 mM
EDTA	2,5 mM

De l'AMPc ^3H-8 est ajouté de manière à obtenir une activité de 100.000 cpm pour 0,05ml de solution.

- La solution radioactive traceuse d'AMPc R_2 est réalisée par dilution au 1/100 dans l'eau de la solution R_1.

Dosage

Le reste du surnageant du broyat de diaphragme obtenu comme nous l'avons indiqué plus haut sert au dosage de l'AMPc. Le surnageant est maintenu à 0º pendant 1 heure, le perchlorate de potassium précipité est séparé après centrifugation. Un millilitre de solution traceuse R_2 est ajoutée au surnageant qui est chromato-

graphié sur une petite colonne de résine contenue dans une pipette Pasteur, surmontée d'un petit entonnoir. La colonne est remplie sur une hauteur de 5cm de la résine lavée.

Après passage du broyat sur la colonne, la résine est rincée avec 10ml d'eau, puis l'AMPc est élué par 10ml d'HCl à pH 2,4. L'effluent acide est lyophylisé, le résidu est repris par 0,8 ml du tampon servant à préparer la solution radioactive R_1 et séparé en trois parties : 0,2ml sont versés dans 10ml de mélange scintillant et serviront au calcul du rendement ; 2 fois 0,2ml servent au dosage proprement dit, la solution est versée dans des tubes à hémolyse dans lesquels 0,05ml de la solution radioactive R_1 sont ajoutés.

Après incubation à 31ºC, 0,05ml de substrat enzymatique sont ajoutés, les tubes agités et après 10 minutes exactement 0,5ml de suspension au 1/2 de la résine servent, en captant l'AMPc, à arrêter la réaction.

Cette suspension est chromatographiée de nouveau sur une colonne remplie sur 2,5cm de résine. L'adénine formée lors de la réaction enzymatique est éluée par 10ml d'eau. Après lyophylisation de l'éluat, 0,2ml d'eau, puis 10ml de mélange scintillant ajoutés, servent à la lecture de la radioactivité tritiée apportée par l'adénine.

Résultats - Discussion

En ne procédant qu'à la partie finale du dosage avec de l'AMPc en quantité connue, nous obtenons une courbe comme celle de la figure 2 où est indiqué l'écart-type sur 6 essais. Nous voyons que cette erreur est assez grande pour entraîner des écarts très grands surtout pour les valeurs élevées d'AMPc.

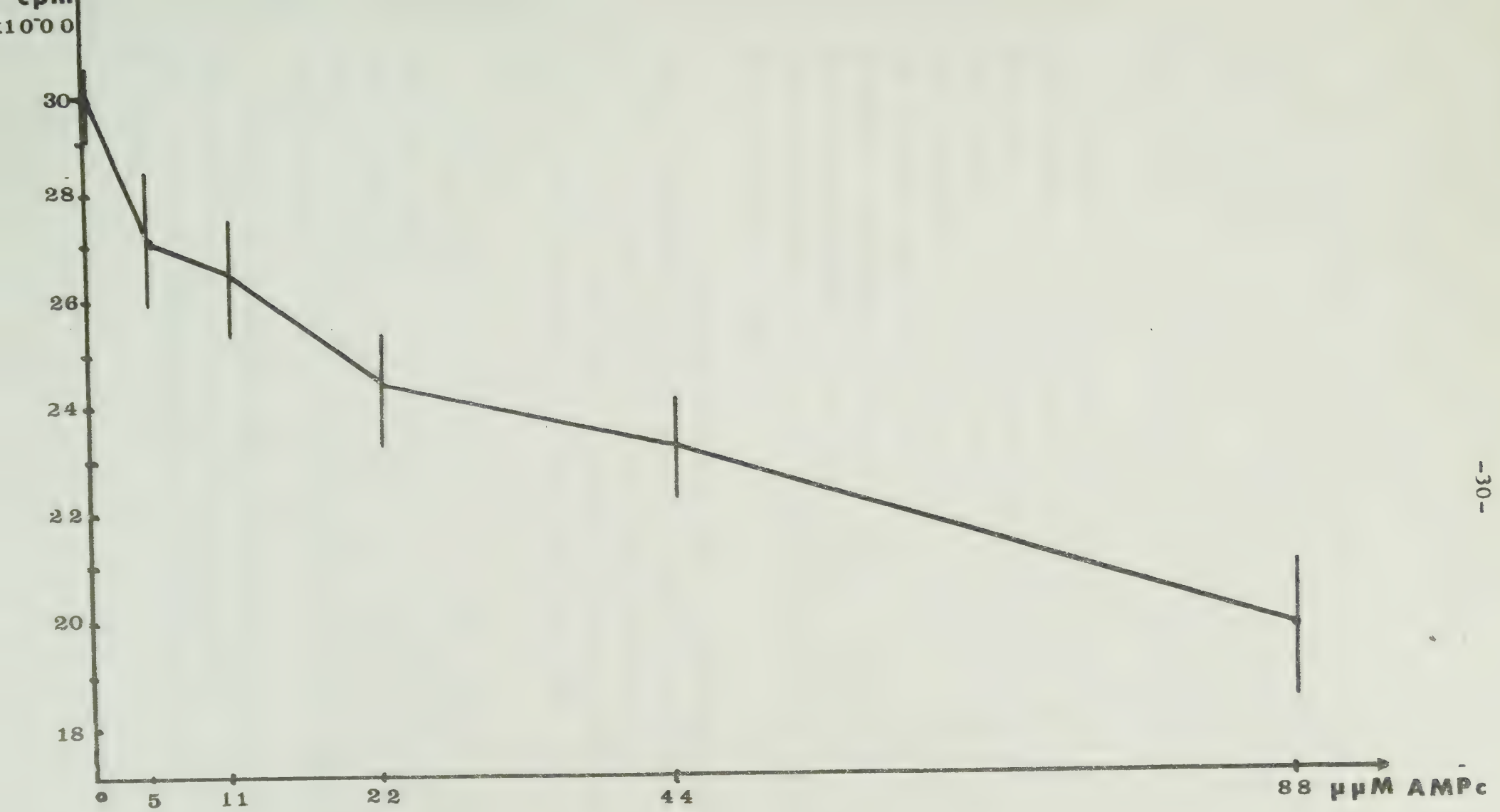


Figure 2 - Courbe d'étalonnage pour le dosage de l'AMPc selon la technique de BROOKER et et coll. (1968) avec l'écart-type pour six déterminations.

Les diaphragmes ayant été traités par le ^{14}C D glucose (U) sont radioactifs, la majeure partie de la radioactivité du broyat n'est pas fixée par la résine et est éluée lors des premières fractions Lorsque l'on ajoute l'acide chlorhydrique, une quantité non négligeable de radioactivité est éluée, cette activité devant correspondre à des métabolites du glucose (Figure 3).

La figure 4 montre que l'AMPc radioactif (apporté par la solution traceuse R_2) n'est pas entièrement fixé par la résine et oblige de ce fait à calculer le pourcentage de récupération de l'AMPc. Nous venons de voir qu'aux mêmes fractions d'élution de l'AMPc, de la radioactivité ^{14}C est éluée. Sur l'appareil utilisé (Tracerlab LSC 10b) nous avons séparé les activités ^{3}H et ^{14}C par la méthode de rapport des canaux. Connaissant l'activité de R_2, le rendement de la chromatographie est calculé (il faut ajouter 10 p.cent venant de la perte lors du prélèvement effectué pour la mesure de la captation du glucose).

Lors de la deuxième chromatographie (après hydrolyse par le système enzymatique), la radioactivité en ^{14}C n'est plus gênante pour deux raisons : elle est très faible par rapport à l'activité tritiée de R_1 et elle reste fixée sur la résine; seules dans la deuxième chromatographie, les fractions éluées par l'eau sont recueillies.

Ce dosage est long et laborieux et n'est pas d'une grande précision. Ainsi certains dosages ont été répétés de nombreuses fois et malgré une grande différence des moyennes des résultats entre les traités et les témoins, aucune signification statistique n'est trouvée à cause de l'extrême dispersion des résultats.

Nous avons cependant gardé ces résultats car bien que non significatifs, ils recoupent les actions observées par inhibition de la phosphodiestérase et surtout sont confirmés par l'autre dosage de l'AMPc.

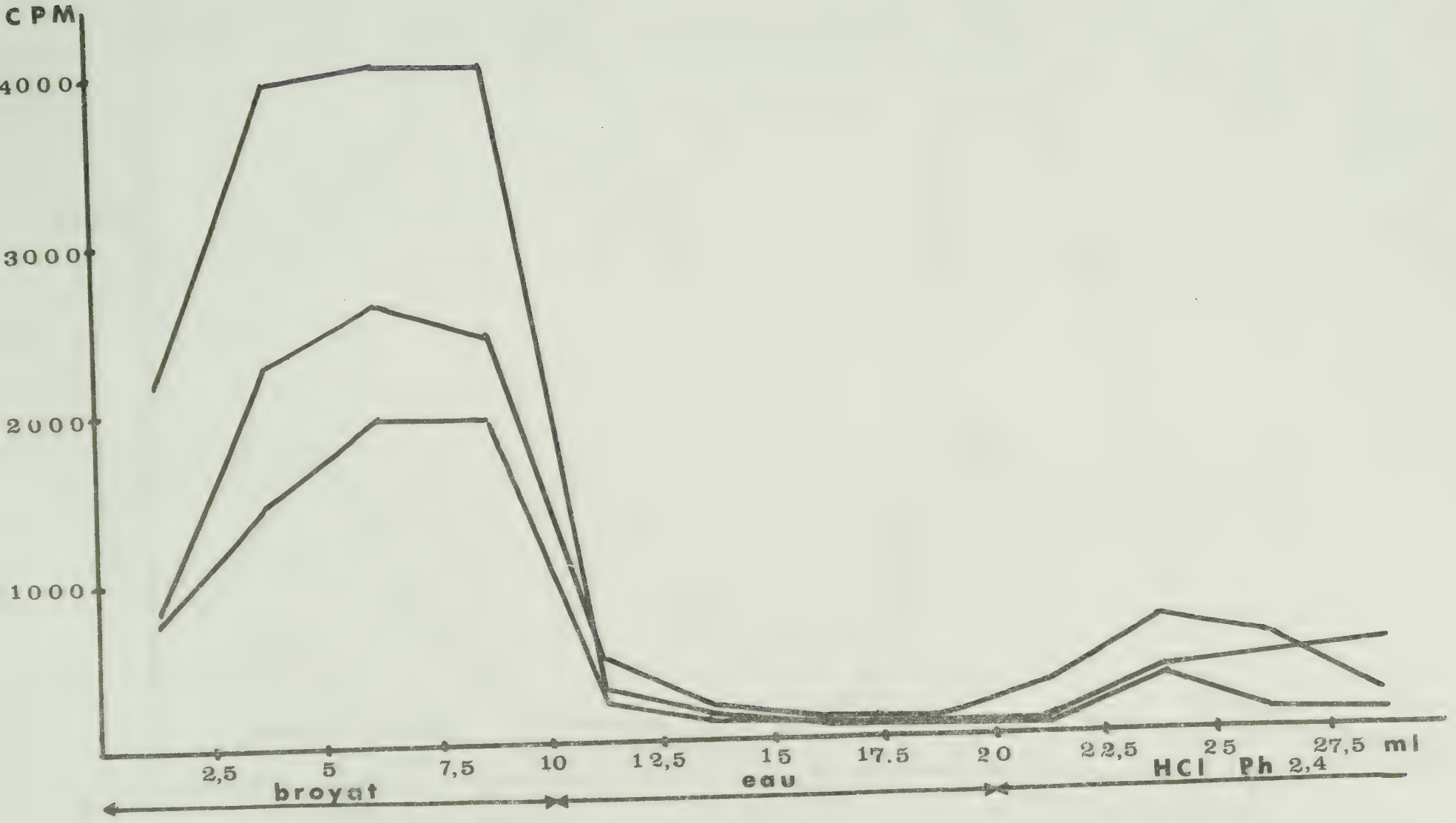


Figure 3 - Radioactivité d'effluents de chromatographie sur résine AG 1X2 de trois broyats de diaphragme traités par le ^{14}C D glucose (U)

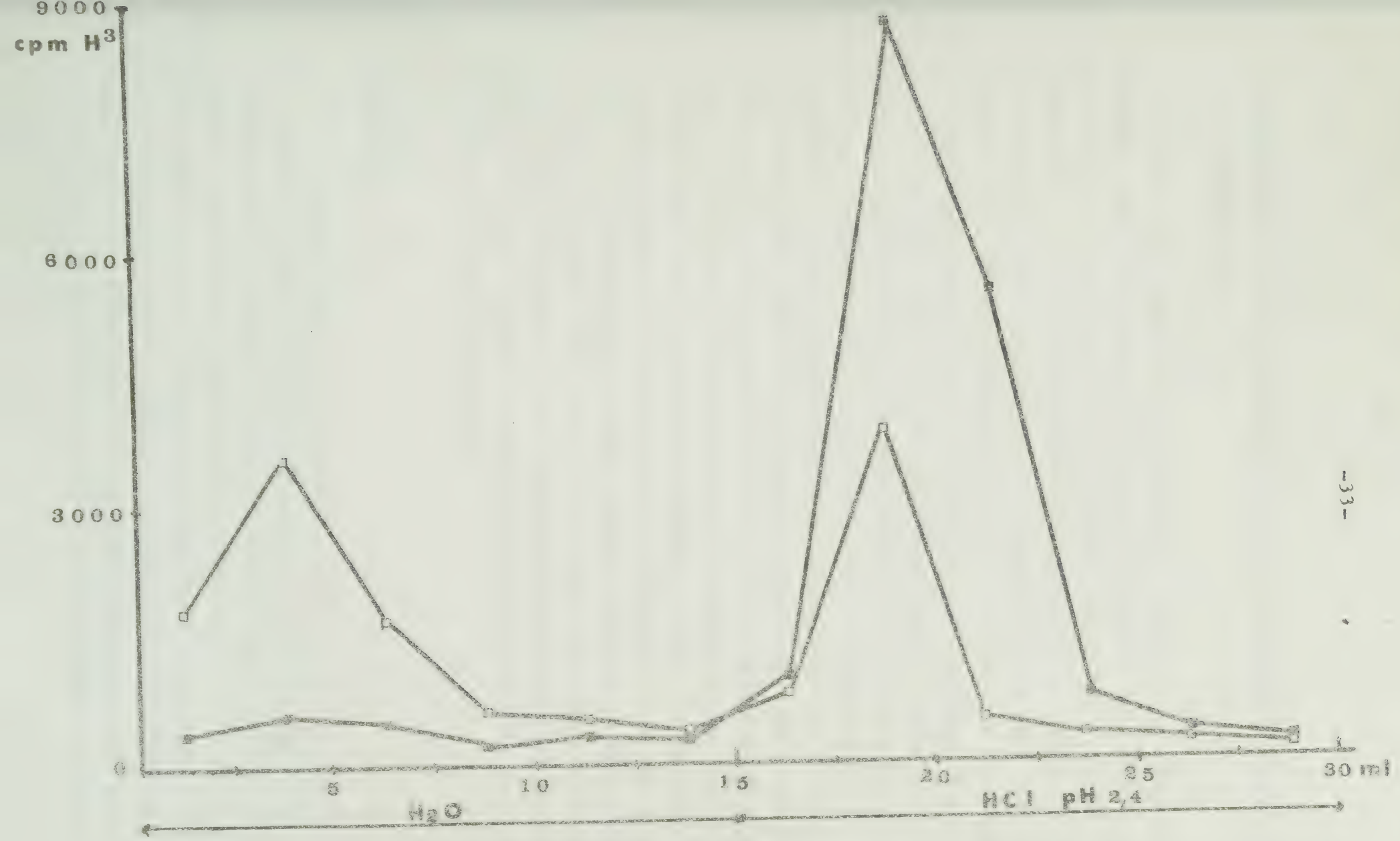


Figure 4 - Chromatographie sur résine AG 1X2, d'AMPc radioactif non hydrolysé ■——■ et après hydrolyse par la phosphodiestérase + 5'nucléotidase □——□ (Fractions de 2,5ml)

C/ APPRECIATION DE LA FORMATION DE L'AMPc PAR MARQUAGE PREALABLE A L'ADENINE ^{3}H-2

Après avoir pratiqué les dosages de l'AMPc selon la méthode de BROOKER (1968) indiquée au paragraphe précédent, nous avons suivi la technique décrite par KUO et De RENZO (1969, KUO (1970), SHIMIZU et coll. (1969),FONTAINE et SALMON (1971) , COUNIS (1971), pour effectuer des appréciations de formation de l'AMPc sous l'influence de la STH et différents autres corps dans les diaphragmes de rats. Ces auteurs travaillent sur des cellules grasses isolées mais notre tissu étant plus compact nous avons dû apporter certaines modifications. Le principe est simple : de l'adénine tritiée est mise en contact avec les cellules qui l'incorporent et le transforment en ATP. Sous l'action de l'adénylcyclase ce corps est transformé en AMPc. En séparant l'AMPc des autres corps marqués au tritium, on peut apprécier l'activité de la cyclase. Ces auteurs opèrent sans aucune chromatographie, la séparation des nucléotides s'effectuant selon la méthode de KRISHNA et coll. (1968)(1970) par précipitation par la baryte et le sulfate de zinc. Ce procédé nous a paru insuffisant,certains composés tritiés et surtout les composés marqués au ^{14}C n'étant pas éliminés par cette technique, nous avons dû procéder à une chromatographie selon une technique proche de celle décrite au chapitre précédent à propos du dosage de l'AMPc par voie enzymatique.

Technique

Les quatre quarts de diaphragme, après un rapide rinçage par une solution de NaCl à 9°/°°tiédie, sont mis pendant une heure à 37ºC dans 5ml de milieu de Krebs contenant 20µCi d'adénine ^{3}H -2 fournie par le C.E.A. (son activité spécifique est de 24 Ci/mM), puis lavés deux fois 5 minutes dans du Krebs sans corps radioactifs et enfin remis à incuber une heure,chaque quart est maintenant séparé dans une fiole avec 5 ml de Krebs renfermant les corps à étudier et le glucose marqué au ^{14}C. Après séchage et pesée, les

fragments tissulaires sont broyés dans 5ml d'acide perchlorique à 0,6 N contenant 0,2ml d'une solution d'AMPc à 1mg/ml (série d'essais sur les actions du potassium) ou 0,5mg/ml (autre série de dosages de l'AMPc).

Le broyat est centrifugé et le surnageant versé dans un tube de 10ml ; après neutralisation par de la potasse 2N en présence de bleu de bromothymol et après avoir complété à 10ml avec de l'eau distillée, 1 ml du liquide est prélevé et servira à la mesure de la captation du D glucose.

Le liquide restant est congelé, puis décongelé, le surnageant transvasé dans un tube, 0,75ml de $ZnSO_4$ (0,3M), puis 0,5ml de $Ba(OH)_2$ 0,25 M (conservée sous huile de vaseline) sont ajoutés, le tube est de nouveau centrifugé.

Le surnageant est chromatographié sur une colonne de 2ml de résine AG 1X2 diluée au 1/2 dans de l'eau. Cette résine est lavée comme il est indiqué au chapitre précédent. La colonne est constit d'une pipette Pasteur surmontée d'un entonnoir.

On lave par 10ml d'eau distillée puis par 10ml d'acide chlorhydrique 0,005 N. Les effluents sont rejetés. On élue par 10ml d'acide chlorhydrique à 0,04 N, l'effluent est recueilli par fractions de 2,5ml. A chaque fraction sont ajoutés 0,1ml de $ZnSO_4$, puis 0,1ml de $Ba(OH)_2$, après centrifugation, la densité optique de chaque fraction est mesurée sur un spectrophotomètre Jobin Yvon à 258nm. Deux cas se présentent alors :-ou bien la densité optique n'est élevée que dans une seule fraction : 2ml de celle-ci sont prélevés après une nouvelle centrifugation de façon à éviter le prélèvement de particules radioactives du précipité. Le prélèvemen est mis dans un flacon type pénicilline et lyophilisé.

-ou bien la densité optique est élevée dans deux fractions, elles sont réunies et après centrifugation 4ml sont prélevés en vue de la lyophilisation.

Après lyophilisation, 0,5ml de tampon phosphate pH 7 (Merck) sont mis sur le résidu,puis une demi-heure après 12ml de mélange de BRAY sont ajoutés. Le flacon séjourne environ 12 heures à 4ºC et 10ml sont versés dans un flacon pour lecture en scintillation liquide, avec lecture séparée du ^{14}C et du ^{3}H.

Du nombre de coups par minute (cpm) de tritium est retranché le nombre de cpm "carbone" multiplié par le facteur de réinjection du carbone dans la voie "tritium". Le résultat de la soustraction est divisé par le pourcentage de récupération et est ramené à 100mg de tissu. On obtient ainsi des cpm/100mg . Nos calculs ne tiennent pas compte du "Quenching" (atténuation) qui est presque égal dans tous les prélèvements.

Cette technique diffère de celle décrite par KUO,MOSKOWITZ, SHIMIZU, par la présence d'une chromatographie et du calcul du pourcentage de récupération. Certains points doivent être explicités.

La dose de radioactivité est double de celle préconisée par KUO. Nos diaphragmes présentent un rapport poids/surface très supérieur à celui des cellules grasses isolées de ces auteurs, c'est le poids supérieur de nos fragments qui explique cette différence. Toutefois certains écarts observés entre témoin et dosage sont assez grands et nous pensons que dans certains cas la dose d'adénine tritiée pourrait être diminuée de moitié.

Le broyage est rendu nécessaire par la texture de notre tissu.

L'adjonction d'AMPc à l'acide perchlorique est inédite pour cette technique mais nous avons suivi l'exemple déjà décrit par BROOKER qui ajoute de l'AMPc radioactif pour suivre la récupération de l'AMPc froid. Il faut remarquer que le pourcentage de récupération ne peut atteindre 100 p.100, en effet, seuls les 9/10 du broyat sont chromatographiés, soit déjà un rendement théorique de 90 p.100 et lors de la reprise des fractions, seuls 2ml sur 2,7 (ou 4 sur 5,4) sont repris, soit une nouvelle perte de 7/27,

environ 26 p.100, le rendement final ne pouvant dépasser en théorie 67 p.100 environ. Le pourcentage de récupération pratique est souvent fort élevé : par exemple pour l'essai portant sur la gamme de différentes doses de potassium il est de 62 p.100 ± 2 p.100.

Le double traitement par la baryte et le sulfate de zinc est efficace. Sur la figure 5 sont reportés les résultats d'une chromatographie d'un mélange d'ADP, ATP, AMP et AMPc à la même concentration avec ou sans traitement par la baryte. Nous voyons que ce traitement élimine tous les nucléotides sauf l'AMPc (cet essai a été réalisé avec des solutions pures des différents nucléotides ce qui explique la différence entre les acides employés ici et ceux employés lors des essais à partir de broyats).

Mais il est aussi à noter que ce traitement n'élimine pas la radioactivité apportée par l'adénine elle-même. Selon MOSKOWITZ l'adénine est entièrement transformée en ATP par la cellule. Ce traitement laisse surtout la radioactivité apportée par le glucose marqué au ^{14}C (Figure 6). Avec l'acide chlorhydrique 0,04 N nous pouvons voir une élution de radioactivité liée au carbone, nous pensons qu'il s'agit peut-être de dérivés phosphorylés du glucose incorporé. Cette radioactivité n'est pas gênante, pouvant être lue séparément elle n'oblige qu'à une correction classique en technique de double marquage. En fait, dans notre cas, cette correction était souvent très faible. En sens inverse, sur les appareils que nous avons pu utiliser * il n'y a pas de réinjection de tritium dans la voie du carbone donc pour l'appréciation de la captation du glucose aucune correction n'est utile.

L'adénine ^{3}H-2est fixée par le tissu d'une manière assez régulière. Cette incorporation doit être active car elle s'effectue contre un gradient de concentration. Elle est concentrée de l'ordre de 5 fois par le tissu par rapport au bain d'incubation.

---

* Appareils HELLWETT,PACKARD TRICARB des services du Professeur G.VALETTE et du Professeur R.MICHEL que nous tenons à remercier.

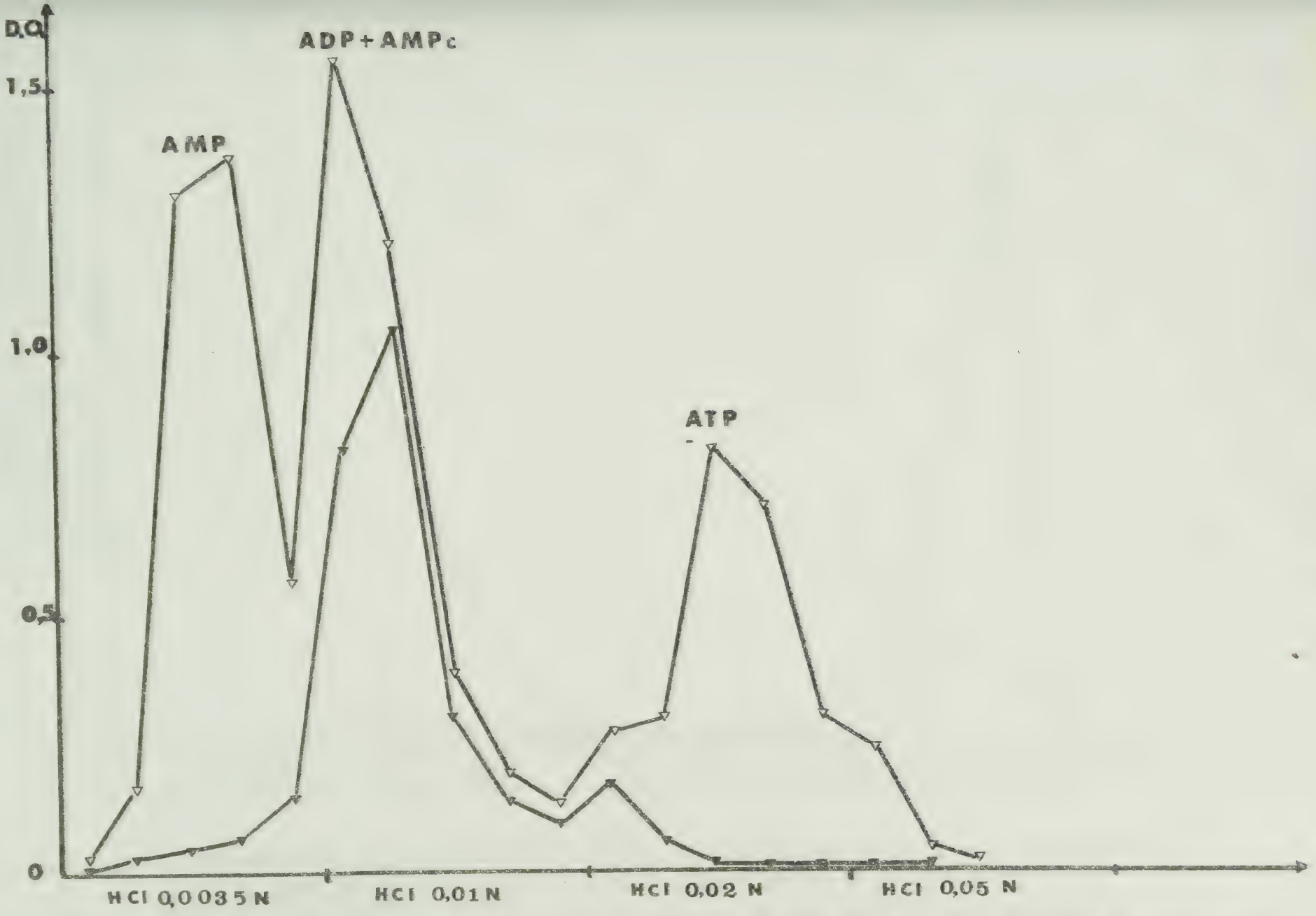


Figure 5 - Densité optique des fractions de 2,5ml d'effluents par de l'acide chlorhydrique d'un mélange ADP, AMP, AMPc et ATP (0,05mg/ml chaque) ▽—▽ et du même mélange après traitement par la baryte + $ZnSO_4$ ▼—▼

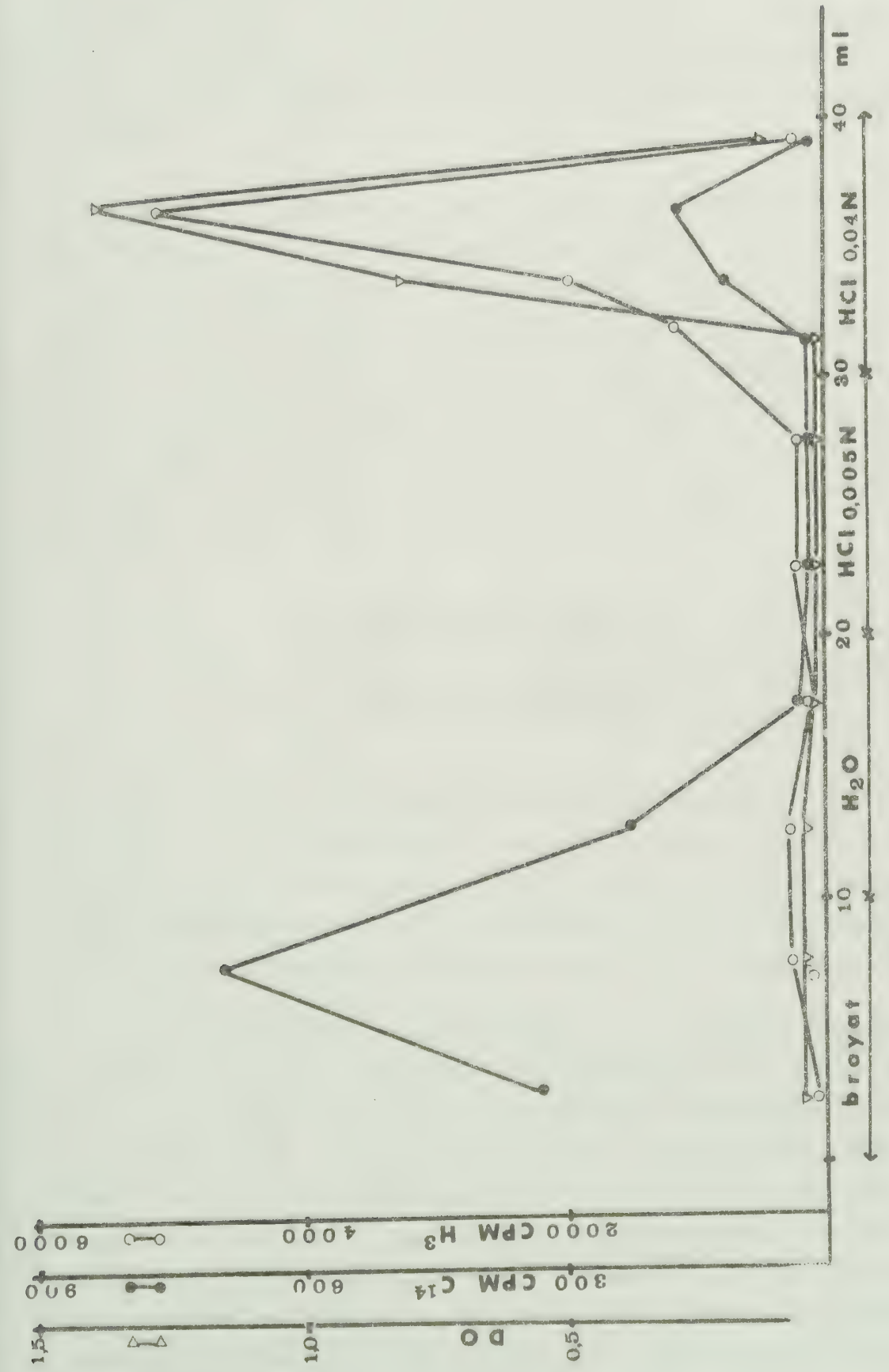


Figure 6 - Chromatographie sur résine AG 1x2 d'un broyat de diaphragme incubé dans de l'adénine 2 H^3 puis dans du ^{14}C D glucose (U). Après broyage surcharge du surnageant avec 0,2ml d'AMPc à 1mg/ml.
Evolution de la densité optique ▽—▽ , du nombre de cpm H_3 O—O , du nombre de cpm C14 ●—● , après élution par 10ml d'eau et 10ml d'HCl 0,005 N et 10ml HCl 0,04 N (Fractions de 5ml pour les trois premiers éluats, 2,5ml pour le dernier)

Cette captation est partiellement réversible. Dans le premier bain de lavage environ 16 p.100 de la radioactivité captée sont rejetés, dans le deuxième 5 p.100. Dans le bain d'incubation, ce rejet est encore notable et est variable suivant les produits présents dans le bain.

La variabilité de ce rejet nous a conduit à calculer un autre paramètre. En effet l'AMPc marqué au tritium produit est proportionnel à la différence d'activité entre l'adénylcyclase et la phosphodiestérase mais aussi à la radioactivité liée à l'ATP. Pour chaque fragment tissulaire nous calculons le pourcentage de transformation de la radioactivité tritiée totale (lue sur le même prélèvement que le ^{14}C du glucose) en AMPc radioactif, puis nous faisons le rapport de ce pourcentage du fragment "dosage" sur le fragment témoin, nous obtenons "R"

$$"R" = \frac{\dfrac{\text{AMPc en cpm/100mg}}{\text{Tritium totalen cpm/100mg}} \text{ du fragment Dosage}}{\dfrac{\text{AMPc en cpm/100mg}}{\text{Tritium totalen cpm/100mg}} \text{ du fragment Témoin}} \times 100$$

La lecture de la densité optique de chaque fraction de l'effluent, tout en permettant de calculer le pourcentage de rendement permet d'éliminer une partie du ^{14}C et de ne lyophiliser que de petits volumes. La perte de rendement est assez faible, la radioactivité des fractions écartées étant faible elle aussi.

La congélation et la décongélation constitue une étape très importante malgré sa facilité : le perchlorate de potassium ne se forme pas instantanément et possède une certaine solubilité, à froid sa précipitation est accélérée et est plus complète. Sicette étape n'est pas réalisée l'AMPc peut être élué précocement par la première fraction acide, par l'eau ou même lors du passage du résultat du broyage et ce d'une manière nous semble-t-il assez imprévisible. Nous pensons que les sels non précipités tendent à saturer la capacité de fixation de la résine qui serait rendue inapte à fixer l'AMPc.

Cette technique, à notre avis, présente beaucoup d'avantages :

- elle peut être effectuée sur des séries relativement grandes (en ce qui nous concerne 24 échantillons à la fois),
- elle ne nécessite pas de matériel très complexe et est peu onéreuse,
- elle est d'une exécution relativement aisée mais elle présente cependant un défaut majeur : si elle permet d'apprécier la formation d'AMPc in vitro sous l'influence de divers stimuli elle ne constitue pas un dosage en valeur absolue de l'AMPc, il faut toujours comparer le résultat avec un témoin traité dans les mêmes conditions, ce qui exclut tous les travaux sur l'animal entier.

D/ MESURE DE L'ACIDE LACTIQUE produit par les diaphragmes

Le dosage de l'acide lactique repose sur le principe suivant : l'acide lactique en présence de lacticodéshydrogénase (LDH) est transformé en acide pyruvique, tandis que le NAD est transformé en $NADH_2$ suivant la réaction :

$$CH_3 - \underset{\underset{H}{\overset{O}{}}}{\overset{H}{C}} - COOH + NAD \xrightarrow{LDH} CH_3CO - COOH + NADH_2$$

Le $NADH_2$ a une absorption à 340nm très supérieure à celle du NAD, la différence de densité optique entre le début et la fin de l'incubation permet de calculer la concentration de l'acide lactique.

Réactif*

Tampon glycine 0,5 M hydrazine 0,4 M pH 9
NAD 27 mM
LDH 2mg/ml
acide perchlorique 0,6 M

Technique

0,5ml du milieu d'incubation sont déféqués par un ml d'acide perchlorique, puis centrifugés.

0,2ml du surnageant sont mis à incuber 1 heure à 25ºC avec 2ml du tampon, 0,2ml de NAD et 0,02ml de LDH. Pour le témoin, le surnageant est remplacé par 0,2ml d'acide perchlorique.

Le zéro est fait sur le témoin, les dosages sont lus à 340nm, la différence de densité optique est convertie en mg d'acide lactique grâce à des tables fournies par le fabricant. La concentration en acide est rapportée à 100mg de tissu et à une heure d'incubation.

E/ MESURE DU $^{14}CO_2$ produit par les diaphragmes

A la fin de l'incubation, après avoir enlevé les diaphragmes, 2ml d'acide sulfurique 2N sont ajoutés au bain. Le CO_2 total est capté par 0,1 ml de potasse à 30 p.100 imprégnant un carré de papier filtre accroché à l'intérieur de l'erlenmeyer dès le début de l'incubation. Le papier imprégné est laissé 12h après l'adjonction de l'acide. Un témoin de ^{14}C D glucose (U) est réalisé dans les mêmes conditions.

Le papier filtre est plongé dans 10ml de mélange de Bray. En tenant compte de l'activité du témoin nous calculons le nombre de cpm de ^{14}C O_2 pour 100mg de diaphragme.

F/ MESURE DU FLUX SORTANT de ^{14}C

Par les mesures de captation, nous pouvons apprécier les flux du D xylose ou du D glucose dans le sens du milieu extracellulaire vers le milieu intracellulaire. Il nous est apparu intéressant de voir si un flux inverse existe d'autant que nous avons

remarqué que la radioactivité liée au tritium des diaphragmes variait selon le traitement auquel ils étaient soumis.

L'expérience de la mesure du flux sortant du ^{14}C est calquée sur celle du tritium, les quarts de diaphragmes sont mis à incuber une heure dans un même bain de 5ml de liquide de Krebs contenant 2mg/ml de glucose avec comme traceur 0,8µC/ml de ^{14}C D glucose (U) (soit quatre fois les doses employées pour les mesures de captation).

Après deux lavages de 5 minutes, les quatre fragments sont mis dans des bains séparés avec 3ml de Krebs contenant les produits à essayer mais sans glucose.

La radioactivité des bains est mesurée après 1h, 3h et 6h, les bains sont renouvelés à chaque mesure. Les durées de séjour des fragments sont donc de 1h, 2h et 3h. Les radioactivités sont rapportées à 100mg de diaphragme et comparées comme pour les captations.

G/ DOSAGE DU GLYCOGENE

Le dosage du glycogène repose sur la coloration que donne ce corps à chaud en présence d'acide sulfurique et d'anthrone; nous avons suivi la technique de précipitation décrite par EBOUE-BONIS et coll. (1967) suivie du dosage décrit par SEIFTER et coll.(1950).

Technique

Le morceau de diaphragme est lavé, séché et pesé puis mis dans 0,5ml de potasse à 30 p.100, le tissu est dissous par 10 minutes de chauffage au bain-marie bouillant, 2ml d'alcool absolu sont ajoutés et mélangés, 0,25ml de cette digestion sont prélevés et servent à la mesure de la captation du glucose.

L'alcool à froid précipite lentement le glycogène,ainsi après un séjour de 24 heures à 0º et centrifugation rapide, 0,5ml du

surnageant servent au dosage du ^{14}C D glucose (U) non incorporé dans le glycogène. Le précipité est relavé avec 2ml d'alcool absolu, puis dissout dans 1 ml de potasse 0,2 N. La moitié de cette potasse est prélevée et permet de mesurer la radioactivité du glycogène.

0,25ml de potasse sont additionnés de 5ml du mélange : H_2SO_4 pur 100ml , H_2O 50ml , anthrone 200mg. Un témoin blanc et un témoin"glucose"sont réalisés avec 0,25ml d'une solution à 25mg/l de glucose.

Après chauffage à 100ºC pendant 5 minutes, les colorations sont lues contre le blanc à 620nm. La valeur du glycogène est appréciée par rapport au témoin "glucose".

Nous appelons "glucose total" la radioactivité totale liée au ^{14}C D glucose (U) capté, glucose "libre" la radioactivité non liée au glycogène et glucose "incorporé" la radioactivité liée au glycogène; ces valeurs sont ramenées à un même poids de tissu.

L'activité spécifique du glycogène représente le rapport

$$\frac{\text{glucose "incorporé"}}{\text{glycogène}}$$

Les rapports suivants sont également calculés :

$$\frac{\text{glucose "libre"}}{\text{glucose "total"}}$$

$$\frac{\text{glucose "incorporé"}}{\text{glucose "total"}}$$

et

$$\frac{\text{glucose "incorporé"}}{\text{glucose "libre"}}$$

PRESENTATION GENERALE DES TABLEAUX

Sur les tableaux, les résultats sont généralement transcrits de la manière suivante :

Les captations des sucres sont exprimées par le rapport des cpm pour 100mg de tissus "dosage" aux cpm pour 100mg de tissu "témoin"; exprimé en pourcentage ce chiffre est précédé entre parenthèses du nombre d'essais, suivi de l'écart-type et de la probabilité. Nous considérons pour $P < 0,01$, le test comme très significatif et $P < 0,05$ comme significatif.

Les résultats des dosages de l'AMPc sont exprimés de deux manières :-pour ceux effectués selon la technique de BROOKER, le rapport en pourcentage de la moyenne arithmétique de l'AMPc des tissus "dosage" sur celui des "témoins" est donné,

-pour les dosages de l'AMPc selon la technique de KUO, trois chiffres peuvent être fournis, d'abord le pourcentage, appelé "Adénine", entre la radioactivité totale en tritium rapportée au même poids de tissu entre les "dosages" et les "témoins"; puis "AMPc" correspond au même calcul fait pour la radioactivité liée à l'AMPc et enfin le rapport "R", ces chiffres pouvant être précédés entre parenthèses du nombre d'essais et suivis de la probabilité.

Nous rappelons que tous les dosages d'AMPc ont été effectués lors des essais avec le D glucose et non avec le D xylose.

D E U X I E M E P A R T I E

ETUDE DE L'ACTION "INSULIN-LIKE" DE LA STH SUR LE DIAPHRAGME ISOLE DE RAT HYPOPHYSECTOMISE

C H A P I T R E III

ACTION DE LA STH SUR LA CAPTATION DES SUCRES ET LA FORMATION DE L'AMPc

Durant les deux heures qui suivent l'administration de STH, on assiste à une captation et à une utilisation accrues du D glucose par les cellules.

Examinons les principales caractéristiques de cette phase A de l'action de la STH.

ACTION SELON LA DUREE DE CONTACT DE LA STH ET DU TISSU

Les effets initiaux de la STH, selon leur nature, peuvent durer de moins de une heure à plusieurs jours.

Généralement, l'annulation des effets de la STH se fait sentir en 1 à 3 heures. Sur le tissu adipeux, GOODMAN (1967a - 1968b) observe la même séquence de captation des sucres que sur le diaphragme. A ce propos il convient de rappeler les expériences de AKERBLOM et coll. (1971) : le tissu adipeux de rattes inoculées par des cellules tumorales hypersécrétantes de STH, conserve pendant 15 à 22 jours après le début de la tumeur (la STH plasmatique étant déjà très augmentée) une faculté de captation du D glucose très augmentée par rapport aux témoins. Cette action ne s'arrête que 22 à 39 jours après l'inoculation de la tumeur. Pour

SWISLOCKI et SZEGO (1965) aussi, des traitements prolongés par la STH sont nécessaires pour provoquer la diminution de la captation du D glucose par le tissu adipeux de rats hypophysectomisés.

ACTION SELON LES DOSES DE STH

L'effet des doses de STH est variable suivant les auteurs. BOLODIA et YOUNG (1967) rapportent qu'une STH bovine purifiée provoque deux effets suivant la dose testée. Une faible dose (inférieure à 0,16µg/ml) décroît la captation du D glucose par le diaphragme isolé de rat. OTTAWAY (1951), BULBROOK et OTTAWAY (1954) ont observé cette diminution mais pas HJALMARSON (1967a) qui trouve une captation accrue pour des concentrations de STH à partir de 0,1 jusqu'à 100µg/ml. Les mêmes contradictions peuvent être retrouvées in vitro sur la captation du D glucose par le coeur de rat perfusé. BRONK et FISHER (1957)trouventune diminution de cette captation par de faibles doses de STH, action non retrouvée par MORGAN et coll. (1961).

GOODMAN (1965 a,b) ne peut observer de relation dose/effet de la STH sur la captation du D glucose et son métabolisme dans la cellule grasse, il observe au contraire de grandes variations d'un sujet à l'autre.

ACTION SELON LES SUCRES

Il y a augmentation de la perméabilité au D glucose des cellules du diaphragme de rat hypophysectomisé (RIDDICK et coll., 1962 - AHREN et HJALMARSON,1968), du coeur (HENDERSON et coll.,1961- MORGAN et coll.,1961), Le dinitrophénol n'empêche pas cette action qui n'a pas besoin d'énergie, la pénétration du sucre est donc passive (GOODMAN,1968d).

La STH in vitro ou après injection intraveineuse ou intrapéritonéale moins d'une heure avant le sacrifice, augmente pour le diaphragme isolé de rat hypophysectomisé la captation d'autres sucres :

- métabolisables comme le D fructose, le D mannose, le D galactose (GOODMAN,1967a),
- peu métabolisables comme le D xylose,
- non métabolisables comme le L arabinose, le 3-O-methyl-glucose (GOODMAN,1966).

ACTION SUR LE GLYCOGENE

La STH n'augmente pas le glycogène dans le tissu adipeux de rat hypophysectomisé (GOODMAN,1965a) mais l'augmente dans le diaphragme de même rat (OTTAWAY,1951 - GOODMAN,1967b). Les hormones qui stimulent l'adénylcyclase hépatique provoquent une fonte du glycogène.

ACTION SUR LE CO_2

La STH provoque une augmentation du CO_2 produit par le muscle (GOODMAN,1965a). KITABCHI et coll. (1970) observent que l'AMPc agit de la même façon sur les cellules adipeuses.

ACTION SUR LES ACIDES AMINES

La STH augmente la captation des acides aminés comme l'acide α amino isobutyrique, l'histidine, la glycine, la leucine et leurs incorporations dans les protéines (sauf le premier qui n'est pas métabolisable) (HJALMARSON et ARHEN,1967a-b - DAWSON et BECK,1968-HJALMARSON,1968a-b-c - PAYNE et KOSTYO,1970 - SWISLOCKI,1970).

ACTION DE LA STH SUR LA LIPOLYSE

MOSKOWITZ et FAID (1970) montrent que la STH est capable d'augmenter le taux d'AMPc et la lipolyse dans les cellules grasses. La STH a une action lipolytique comme l'ACTH (NAKANO et coll.,1970), la noradrénaline, la TSH (MOSKOWITZ et FAIN,1970), le dibutyryl AMPc et la théophylline (GOODMAN,1969a).

Pour expliquer ces constatations on pourrait admettre que la STH augmenterait le taux de production spontanée de l'AMPc ou diminuerait l'activité de la phosphodiestérase (HECHTERMANS,1970).

Nous savons que la STH à dose suffisante augmente la captation des sucres ou des acides aminés en temps court par le diaphragme de rat hypophysectomisé et que, par ailleurs, cette hormone est capable d'augmenter l'AMPc dans d'autres tissus : lymphocytes de thymus (Mac MANUS,1969 - WHITFIELD et coll.,1971), dans le tissu adipeux (MOSKOWITZ et FAIN,1970). La STH doit-elle son action sur le diaphragme à l'AMPc ? Nous avons réalisé les essais suivants : action de doses croissantes de STH sur la captation des sucres; potentialisation par la théophylline de l'action de la STH; puis dans le chapitre suivant : appréciation du CO_2 dégagé, du glycogène synthétisé, de l'acide lactique formé par le diaphragme, pour essayer de suivre le sort du D glucose capté et de voir le rôle éventuel de l'AMPc dans ces actions.

RESULTATS

Sur le tableau IV sont reportées les actions de la STH (*) et/ou de la théophylline sur la captation du ^{14}C D glucose (U) ou du ^{14}C D xylose (U) et la formation de l'AMPc (dosé selon la technique de BROOKER) après une heure d'incubation.

Sur les tableaux V et VI sont reportées les mêmes actions mais l'AMPc est apprécié selon la méthode de KUO. Ces deux tableaux demandent plus d'explications. Ils sont formés de la réunion de plusieurs essais différents, le nombre de diaphragmes testés varie selon les comparaisons effectuées ce qui explique les variations que l'on peut observer par exemple pour la radioactivité tritiée fixée au tissu, l'AMPc formé. Nous avons tenu à présenter ces tableaux d'un abord difficile car ils expliquent le mécanisme de calcul de "R" qui, bien que le recoupant souvent

(*) STH (CHOAY) en flacons de 100 unités Evans, soit environ 5mg de STH. Cette hormone d'origine bovine est conditionnée en présence de lactose (environ 25mg). Nos dilutions d'hormone contiennent donc du lactose. Pour une solution à 5µg/ml de STH cet apport représente environ 25µg/ml de lactose.

TABLEAU IV

Influence de la théophylline (0,5mg/ml) et de la STH (5µg/ml)
sur la captation du ^{14}C D xylose (U) ou du ^{14}C D glucose (U)
et la formation de l'AMPc (dosé selon BROOKER)
par le diaphragme isolé de rat hypophysectomisé après une heure d'incubation

Composition du milieu d'incubation				D xylose en pourcentage D/T	D glucose en pourcentage D/T	AMPc en pourcentage D/T
Témoin		Dosage				
Théo	STH	Théo	STH			
-	-	+	-	(6) 94,6 ± 4,8	(6) 98,1 ± 7,1	
-	-	-	+	(6) 105,2 ± 5,3	(18) 116,0 ± 4,2**	(18) 160
+	-	+	+	(6) 117,4 ± 2,7**	(12) 120,7 ± 4,8**	(12) 339**
-	+	+	+		(6) 107,4 ± 5,9*	(6) 268

() Nombre d'essais

** $P < 0,01$

* $P < 0,05$

est plus le reflet des activités de l'adénylcyclase et de la phosphodiestérase que le pourcentage brut de la formation d'AMPc entre le dosage et son témoin.

Pour le tableau V et la figure 7, l'incubation est de une heure, pour le tableau VI et la figure 8 elle est de une demi-heure.

Le tableau VII et la figure 9 montrent l'action de doses croissantes de STH sur l'AMPc, dosé selon KUO, la captation du D glucose et le rapport "R" en présence de théophylline.

Nous rappelons que les dosages d'AMPc d'une manière ou d'une autre ont été réalisés conjointement aux mesures de captation du D glucose.

La théophylline n'a qu'un effet négligeable sur les paramètres étudiés, si on la fait agir seule, son pouvoir inhibiteur de la phosphodiestérase ne peut s'extérioriser.

La STH accroît peu la captation du D xylose mais beaucoup plus celle du D glucose, elle accroît la formation de l'AMPc mesuré par les deux méthodes utilisées.

Par contre, la théophylline accroît l'action de la STH sur le D xylose et n'a qu'un faible pouvoir potentialisant sur la captation du D glucose et de l'AMPc; et même, en une demi-heure, elle entraîne une inhibition de la captation du D glucose par la STH.

L'examen du tableau VII et de la figure 9 montre une relation dose/effet de la STH (en présence de théophylline) sur la captation du D glucose, la formation de l'AMPc et le rapport "R"

TABLEAU V

Action de la théophylline (0,5mg/ml, de la STH (5µg/ml) sur la captation du D glucose, l'adénine retenue par le tissu, la transformation de l'adénine $^3H_2$ en AMPc par le diaphragme isolé de rat hypophysectomisé après une heure d'incubation (6 essais par expérience)

	Composition du milieu d'incubation							
	Témoin O	Dosage Théo	Témoin O	Dosage STH	Témoins Théo	Dosage STH+Théo	Témoin STH	Dosage STH+Théo
Captation du D glucose en pourcentage D/T	101,7 ± 4,7		112,9 ± 3,9*		118,6 ± 2,2**		105,8 ± 1,4**	
Radioactivité tritiée retenue en cpm/100mg	441700 ± 65500	419000 ± 33100	441700 ± 65500	600000 ± 56000	419000 ± 33100	602100 ± 57600	600000 ± 56000	602100 ± 57600
Pourcentage de tritium retenu D/T	94,9		135,8		143,7		100,3	
AMPc formé en cpm/100mg	9479 ± 1437	9302 ± 693	9479 ± 1437	16333 ± 1495	9302 ± 693	19500 ± 1160	16333 ± 1495	19500 ± 1160
AMPc formé en pourcentage D/T	98,1		172,3**		209,6**		119,4	
Pourcentage de transformation de l'adénine en AMPc	2,36 ± 0,51	2,32 ± 0,32	2,36 ± 0,51	2,90 ± 0,42	2,32 ± 0,32	3,39 ± 0,32	2,90 ± 0,42	3,39 ± 0,32
"R"	98,3		122,9		146,1*		116,9	

Les pourcentages D/T d'activité tritiée, d'AMPc formé et "R" sont calculés à partir des moyennes des déterminations et non la moyenne des pourcentages des déterminations individuelles.

* $P < 0,05$ ** $P < 0,01$

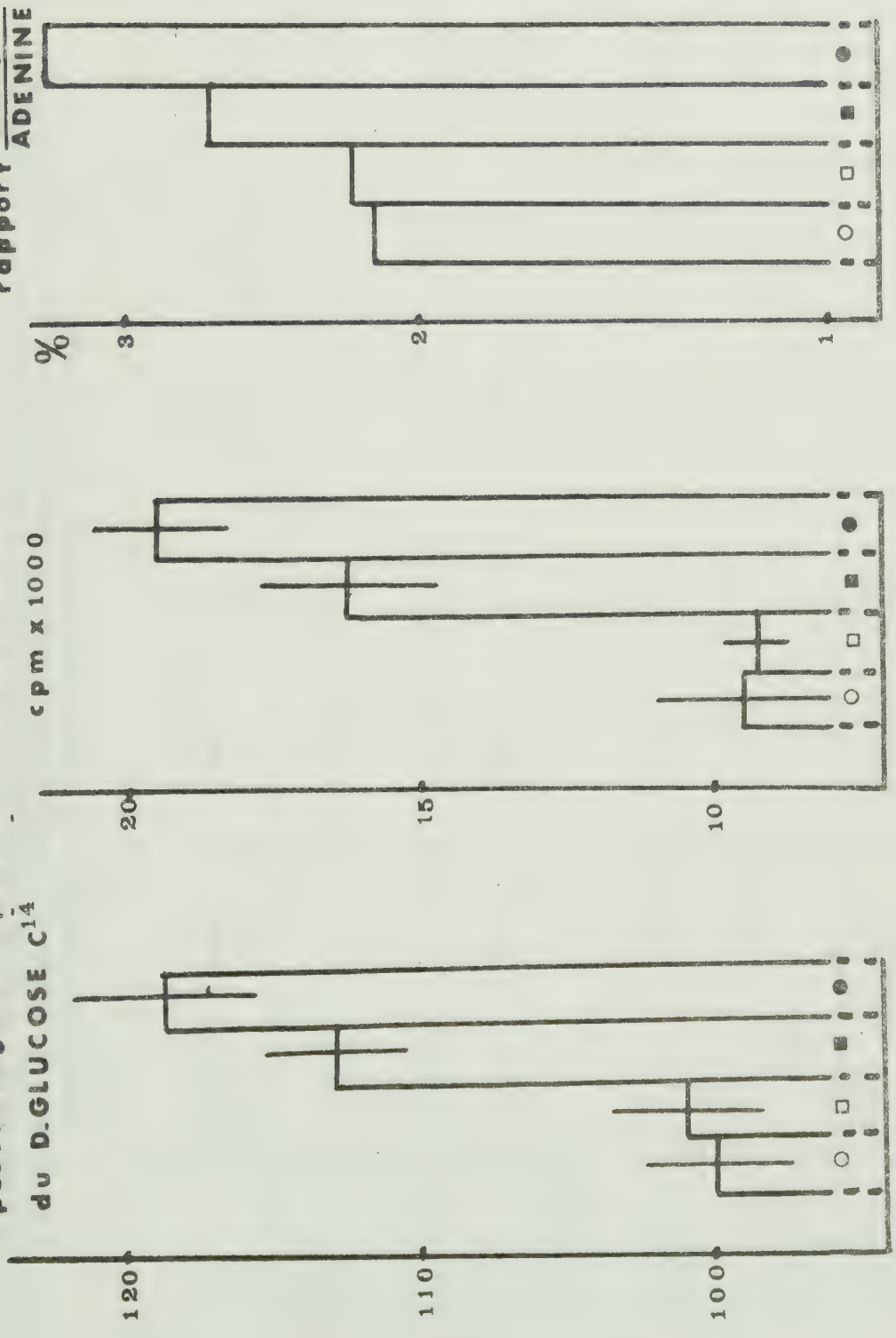


Figure 7 - Par rapport au témoin ○ , actions de la théophylline (0,5mg/ml) □ , de la STH (5µg/ml) ■ et de la STH + théophylline ● sur la captation du ^{14}C D glucose (U) , de l'AMPc formé à partir d'adénine 2 H_3 et le pourcentage de transformation de l'adénine en AMPc par le diaphragme isolé de rat hypophysectomisé.

x P < 0,05

xx P < 0,01

TABLEAU VI

Action de la STH (10µg/ml) et de la théophylline (0,5mg/ml) sur la captation du ^{14}C D glucose (U) la radioactivité tritiée, l'AMPc formé à partir d'adénine $^{3}H_2$ et le rapport "R" après une demi-heure d'incubation (6 essais par expérience)

	Composition des milieux d'incubation							
	Témoin -	Dosage Théo	Témoin 0	Dosage STH	Témoin Théo	Dosage STH+Théo	Témoin STH	Dosage STH + Théo
Captation du glucose en pourcentage D/T	111,1 ± 4,6		118,0 ± 7,4*		97,8 ± 1,5		92,5 ± 3,9*	
Activité tritiée en cpm/100mg de tissu	481300 ± 30000	512500 ± 58700	481300 ± 30000	594100 ± 55700	512500 ± 58700	518500 ± 22700	594100 ± 55700	518500 ± 22700
Activité tritiée en pourcentage D/T	106,5		123,4		101,2		87,3	
AMPc formé en cpm/100g de de tissu	15630 ± 2290	24560 ± 2210	15630 ± 2290	27960 ± 4250	24560 ± 2210	25070 ± 1720	27960 ± 4250	25070 ± 1720
Pourcentage D/T d'AMPc formé	157,1		178,9*		102,7		89,7	
Pourcentage de transformation de l'adénine en AMPc	3,41 ± 0,47	5,13 ± 0,34	3,41 ± 0,47	4,75 ± 0,52	5,13 ± 0,34	5,07 ± 0,40	4,75 ± 0,52	5,07 ± 0,40
"R"	150,4**		139,3**		98,8		106,7	

Les pourcentages D/T d'activité tritiée, d'AMPc formé et "R" sont calculés à partir des moyennes des déterminations et non de la moyenne des pourcentages des déterminations individuelles.

* $P < 0,05$ ** $P < 0,01$

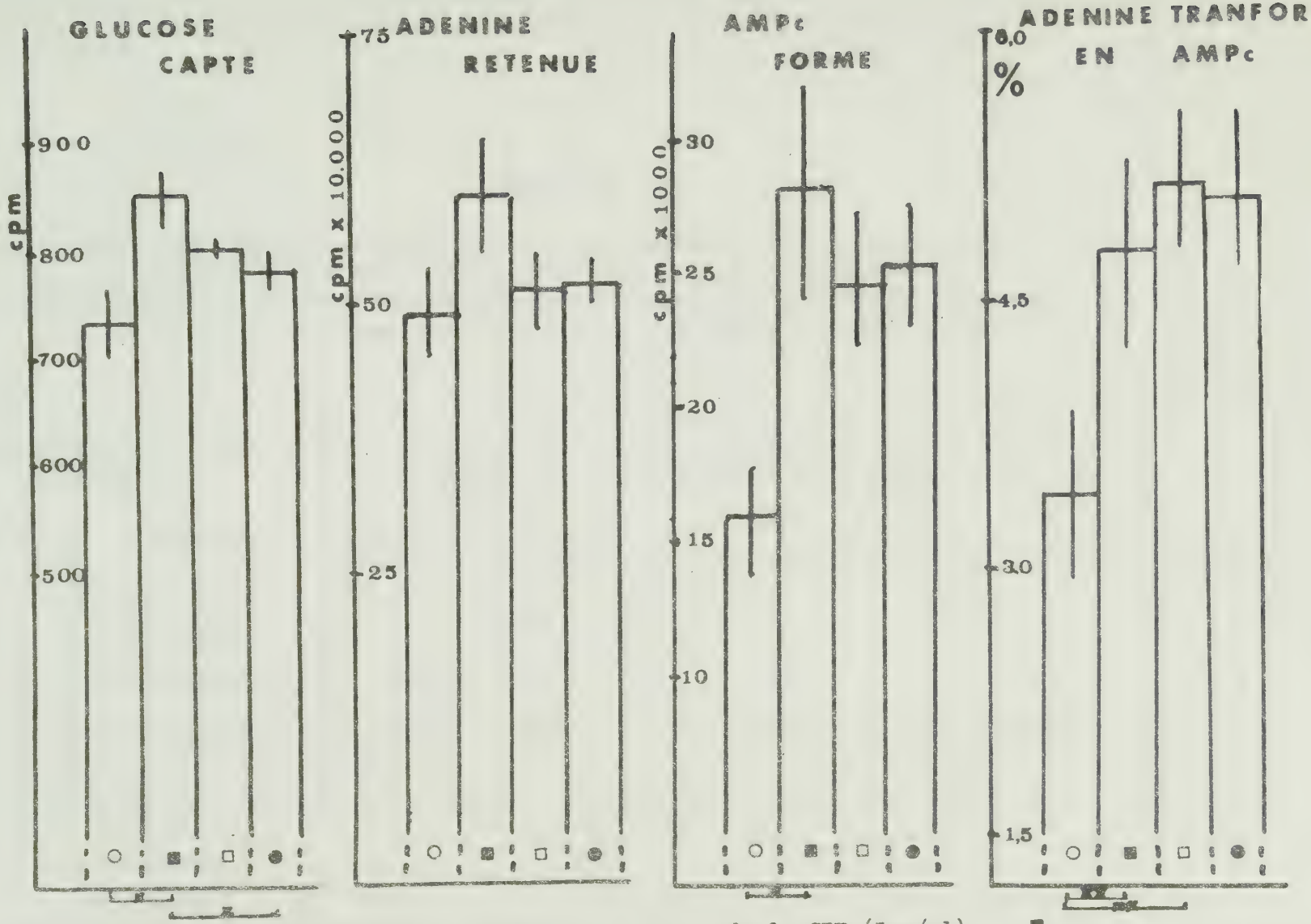


Figure 8 - Action par rapport à un témoin ○ , de la STH (5µg/ml) ■ ,
de la théophylline (0,5mg/ml) □ et de la STH + théophylline ● ,
sur la captation du ^{14}C D glucose (U), de l'adénine 2 H^3 retenue, de l'AMPc formé
et du rapport "R" par la diaphragme isolé de rat hypophysectomisé après une
incubation de 30 minutes. x P 0,05 xx P 0,01

TABLEAU VII

Action de différentes doses de STH sur la captation du D glucose $C^{14}(U)$, la formation de l'AMPc à partir d'adénine 2 H^3 et le rapport "R" par le diaphragme isolé de rat hypophysectomisé après une incubation de une heure, en présence de théophylline (0,5 mg/ml) (6 essais par expérience)

Composition du milieu d'incubation		Captation du D glucose en pourcentage D/T	Radioactivité tritiée retenue en pourcentage D/T	AMPc formé en pourcent. D/T	R
Témoin	Dosages				
-	STH 5µg/ml	112,3 ± 8,3*	121,5	147,0*	121,0
-	STH 20µg/ml	118,0 ± 7,5**	132,1	163,7	123,9
-	STH 80µg/ml	118,5 ± 7,8**	102,3	184,6*	180,3

* $P < 0,05$

** $P < 0,01$

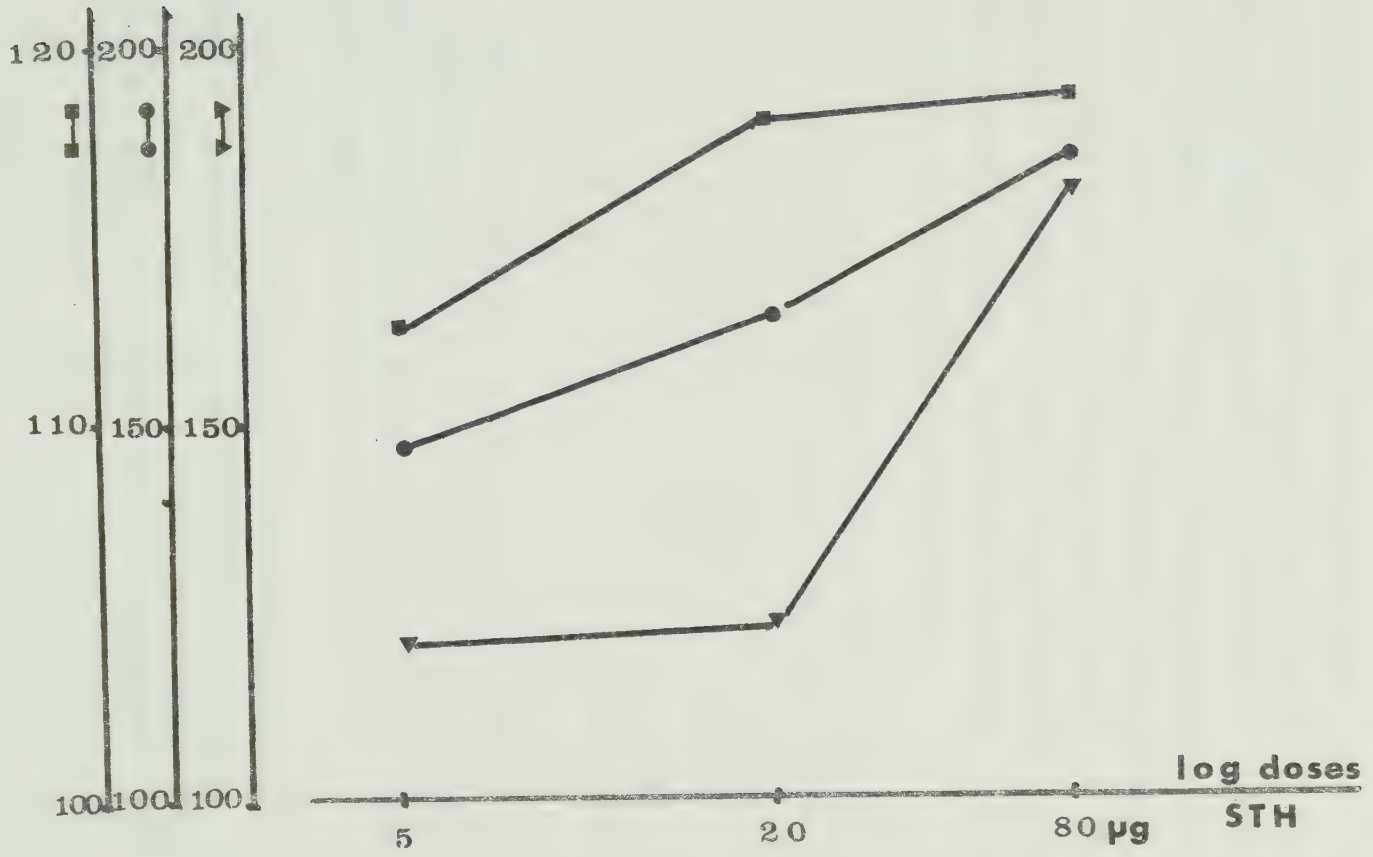


Figure 9 - Actions sur le diaphragme isolé de rat hypophysectomisé, en présence de théophylline, de la STH à différentes doses, sur la captation du ^{14}C D glucose (U) ■—■ , de l'AMPc formé à partir d'adénine 2 H_3 ●—● et du rapport "R" ▼—▼ , par rapport à un témoin non traité.

DISCUSSION

Pour RODBELL (1967), la théophylline inhibe le métabolisme du D glucose par les cellules adipeuses. La légère inhibition de la captation des deux sucres ne peut donc nous étonner, mais une étude plus pousséo montre qu'initialement la théophylline en une demi-heure augmente la captation du D glucose et la formation de l'AMPc. L'essentiel est de considérer les effets de la STH vis à vis des témoins. L'hormone augmente la captation des deux sucres; pour le D xylose cette action est faible, nous retrouvons le phénomène déjà décrit par PARK et coll. (1952), DAWSON et BECK (1968), DAUGHADAY et KNIPIS (1966) et l'ensemble des travaux de GOODMAN et HJALMARSON.

Nous pouvons remarquer que la STH ralentit la fuite du tritium lié à l'adénine et présent à l'intérieur de la cellule sous forme d'ATP (SHIMIZU,1969) et aussi un peu sous forme d'AMPc. La STH,nous le voyons, est capable de modifier la perméabilité cellulaire dans le sens de l'entrée mais aussi de la sortie, point que nous étudierons ulérieurement (Chapitre IV).

Nous remarquons cependant que les rapports des captations du D glucose ou de l'activité tritiée restante dans les cellules entre les diaphragmes traités par la STH et leurs témoins sont proches comme le souligne ce tableau.

Temps d'incubation	Captation du D glucose en pourcentage STH/témoin	Activité tritiée
1 h	112,9	111,5
1/2h	115,9	127,9

Le même phénomène peut régir ces deux passages.

La formation d'AMPc en une heure par la STH est augmentée que cette formation soit mesurée par la méthode de BROOKER ou par la méthode de KUO.

Le rapport "R" a une valeur plus faible que le pourcentage d'AMPc formé, ce qui est normal puisque la STH entraîne une rétention d' "ATP" dans la cellule. Il y a plus d'AMPc formé dans les tissus traités par la STH que dans les tissus témoins par addition de deux phénomènes : activation de la cyclase et augmentation du substrat.

GOODMAN (1967a) et RILLEMA et KOSTYO (1971) ont montré que la STH a une période réfractaire de 15 minutes environ. Nous observons que la théophylline peut provoquer un allongement de cette période : ainsi en 30 minutes, la STH associée à la théophylline n'augmente pas la captation du D glucose, la formation de l'AMPc et le rapport "R", ces actions n'apparaissant qu'au bout d'une heure.

Une différence existe entre les captations du D xylose ou du D glucose en une heure, la STH est peu active sur la captation du premier, la théophylline potentialise cette action, pour le deuxième sucre la STH seule manifeste un pouvoir hypercaptant, peu potentialisable par la théophylline. EICHORN et HECHTER (1961) ont montré avec de l'insuline que le D xylose pouvait être capté contre un gradient de D glucose. La STH par l'intermédiaire de l'AMPc entraîne une entrée du D xylose, la théophylline en potentialisant l'action de la STH sur l'AMPc augmente cette captation.

Pour le D glucose, l'augmentation d'AMPc par la théophylline + STH en provoquant une glycogénolyse empêche cette captation en modifiant le gradient de concentration de glucose. Nous étudions cette glycogénolyse dans le chapitre suivant.

La différence entre les deux sucres peut avoir une autre origine si pour WOOL (1960), BATTAGLIA et RANDLE (1960), le D xylose et le D glucose ont le même processus de rentrée dans la cellule, il n'en reste pas moins que pour le pentose le processus passif (diffusion facilitée) est peut-être prépondérant aux passages actifs, l'AMPc pourrait n'agir que sur le passage passif. L'action potentialisante de la théophylline sur l'AMPc augmenterait le passage passif d'où l'action nette pour le D xylose. Pour le D glucose le passage actif, non modifié par l'AMPc, serait prépondérant au passif, l'augmentation de ce dernier passerait inaperçu dans le flux actif.

Les différences de captation des sucres sont plus faibles que celles trouvées par HJALMARSON (1967a-b). Plusieurs causes peuvent être imputées, les rats que nous employons sont plus gros et leur métabolisme est moins intense que celui de jeunes rats d'où une première source de différences. Nos doses de STH sont plus faibles que celles d'HJALMARSON (5µg/ml au lieu de 25µg/ml), nous nous rapprochons des résultats de JUSKOWITZ (1971) qui retrouve les mêmes résultats qualitatifs mais non quantitatifs.

GOODMAN (1965a-b) n'a pu trouver de relation dose/effet de la STH, le tableau VII et la figure 9 montrent cependant qu'une relation sur la captation du D glucose la formation de l'AMPc et "R" entre les effets et les doses de STH peut exister.

CONCLUSIONS

Cette étude de l'action de la STH montre donc qu'il y a augmentation simultanée de l'AMPc et de la captation des sucres étudiés, les deux phénomènes pouvant sembler liés; mais pour être complet, il faut envisager le métabolisme du D glucose et voir si l'augmentation observée de l'AMPc par la STH peut rendre compte des transformations intracellulaires du D glucose.

C H A P I T R E IV

ACTIONS DE LA STH SUR LE METABOLISME DU D GLUCOSE

Au chapitre précédent, nous avons vu l'action de la STH et/ou de la théophylline sur la captation du D glucose par le diaphragme isolé de rat hypophysectomisé. Que devient ce sucre une fois entré dans la cellule ?

Nous avons d'abord étudié le mouvement inverse à travers la membrane, c'est-à-dire la "sortie" du glucose de la cellule.

Le métabolisme est suivi par la mesure de l'acide lactique libéré dans le bain d'incubation et le CO_2 radioactif produit par le diaphragme.

Puis nous avons étudié la répartition du D glucose capté entre le glycogène et la fraction non incorporée dans le glycogène, fraction appelée "glucose libre" (MORGAN et coll.,1961) bien que ce glucose "libre" corresponde beaucoup plus à divers métabolites, esters phosphoriques du sucre qu'au glucose libre à proprement parler.

Les différentes techniques employées sont décrites au chapitre II "Méthodes et matériels".

RESULTATS

La tableau VIII montre que la STH et la théophylline n'ont pas d'influence mais que leur association ralentit le flux sortant de ^{14}C (apporté par le ^{14}C D glucose (U)) de la cellule vers le bain d'incubation.

La production d'acide lactique dans le bain, peu affectée par la théophylline, est augmentée par la STH. L'association théophylline + STH montre un effet inhibant de la théophylline sur l'action de la STH.

La production de gaz carbonique est diminuée par la théophylline, n'est augmentée par la STH qu'à la dose de 10µg/ml, la théophylline réduisant l'action de l'hormone comme le montre le tableau IX.

Le tableau X montre la répartition du D glucose capté entre le glycogène et la fraction "libre".

La théophylline n'augmente que peu le glycogène, la STH a une forte action positive, mais la théophylline en milieu STH provoque une forte diminution du glycogène. L'incorporation du D glucose radioactif dans le glycogène, les rapports du ^{14}C glucose "incorporé" par rapport au glycogène (activité spécifique du glycogène) ou par rapport à la captation totale conduisent aux mêmes résultats : la théophylline diminue l'incorporation, la STH l'augmente, l'association des deux par rapport à la théophylline est sans effet, mais par rapport à la STH elle conduit à une forte diminution.

La fraction "libre" est toujours augmentée par la théophylline, la STH ou leur association. Mais si l'on compare le rapport entre le glucose "libre" et la captation totale, nous voyons que la théophylline l'augmente et la STH le diminue.

TABLEAU VIII

Acide lactique et ^{14}C provenant du ^{14}C D glucose (U)
libérés dans le bain d'incubation sous l'influence de la STH (20µg/ml), de la théophylline (0,5mg/ml)
par le diaphragme isolé de rat hypophysectomisé après une heure d'incubation
(6 essais par expérience)

Composition du bain d'incubation				Acide lactique en pourcentage D/T	^{14}C libre dans le bain en pourcentage D/T
Témoin		Dosage			
STH	Théo	STH	Théo		
-	-	+	-	$156,8 \pm 13,6$**	$102,3 \pm 2,3$
-	-	-	+	$117,6 \pm 6,7$	$100,5 \pm 4,1$
+	-	+	+	$92,9 \pm 5,0$	$92,6 \pm 3,5$
-	+	+	+	$126,6 \pm 15,8$	$95,4 \pm 6,8$

** $P < 0,01$

TABLEAU IX

$^{14}CO_2$ produit par les diaphragmes isolés de rats hypophysectomisés sous l'influence de la STH et de la théophylline (0,5mg/ml) en 1/2h ou 1 heure d'incubation

Composition du milieu d'incubation				Temps d'incubation	
Témoin		Dosage		1/2h	1h
-	-	-	+[3]		(4) 96,2 ± 10,5
-	-	-	+[2]	(16) 135,5 ± 13,6	(5) 117,1 ± 11,1
			+[1]		(6) 98,7 ± 8,4
-	-	+	-	(6) 77,5 ± 10,3	(9) 97,9 ± 7,3
+		+	+[2]	(4) 144,8 ± 70,2	
	+	+	+[3]		(5) 97,2 ± 7,1
+		+	+[3]		(5) 86,3 ± 9,0
+		+	+[1]		(5) 109,0 ± 14,0
	+	+	+[1]		(6) 86,5 ± 8,4

1 = STH 5µg/ml 2 = STH 10µg/ml 3 = STH 20µg/ml

( ) Nombre d'essais

TABLEAU X

Action de la STH (20µg/ml) et de la théophylline (0,5mg/ml) sur le glycogène, l'incorporation du ^{14}C dans le glycogène, l'activité spécifique du glycogène, l'incorporation dans le glycogène par rapport à la captation totale, le glucose "libre", le glucose "libre" par rapport à la captation totale et le glucose incorporé dans le glycogène par rapport au glucose "libre" en 1 heure sur le diaphragme isolé de rat hypophysectomisé (11 essais par expérience)

Composition du milieu d'incubation				Glycogène	Glucose "incorporé"	Activité spécifique du glycogène	Glucose "incorporé" / Glucose "total"	Glucose "libre"	Glucose "libre" / Glucose "total"	Glucose "incorporé" / Glucose "libre"
Témoin Théo	Témoin STH	Dosage Théo	Dosage STH	pourcent. D/T	pourcent. D/T	en pourcent. D/T	en pourcentage D/T	pourcent. D/T	en pourcentage D/T	en pourcentage D/T
-	-	+	-	118,1 ± 9,1	65,6** ± 5,3	59,6** ± 3,7	72,8* ± 5,0	110,0 ± 4,4	111,6 ± 5,8	75,6* ± 9,0
-	-	-	+	134,7 ± 15,8	146,6** ± 13,0	118,0 ± 14,0	116,7* ± 6,0	113,7 ± 9,5	89,7 ± 4,4	162,2 ± 16,0
+	-	+	+	96,4 ± 8,2	128,8 ± 15,9	109,0 ± 8,4	102,6 ± 7,8	106,1 ± 6,1	95,2 ± 3,0	121,5 ± 13,5
-	+	+	+	76,7** ± 5,8	54,0** ± 4,4	76,4* ± 5,9	66,5** ± 5,3	102,4 ± 5,4	105,4 ± 4,8	53,9** ± 4,0

* $P < 0,05$ ** $P < 0,01$

glucose "incorporé" : radioactivité apportée par le glucose, présente dans le glycogène

glucose "libre" : radioactivité apportée par le glucose non "incorporé"

glucose "total" : radioactivité apportée par le glucose, présente dans tout le tissu

DISCUSSION

L'acide lactique est augmenté dans le bain d'incubation par action de l'ACTH, de l'AMPc et du dibutyryl AMPc sur les surrénales de souris in vitro (BARTOVA et BIRMINGHAM,1971), par l'adrénaline sur le tissu adipeux de rat (BEVIZ et coll.,1971), par la TSH sur la thyroïde (GILMAN et RALL,1968 a-b), par l'AMPc et son dérivé monobutyrylé et l'adrénaline dans le plasma du chien (HENION et coll.,1967).

Nous voyons que la STH seule augmente l'acide lactique rejeté dans le bain, ce qui semble en faveur d'une action passant par l'AMPc, les deux paramètres étant augmentés simultanément, mais nous pouvons voir dans le tableau VIII que l'association STH + théophylline par rapport à la STH seule provoque une diminution de ce rejet, non significative, certes, mais indiquant qu'il n'y a pas de potentialisation de l'action des deux composés. Cette diminution de rejet est parallèle à la réduction du flux sortant de ^{14}C provoquée par l'association STH + théophylline Nous mesurons le seul acide rejeté dans le bain d'incubation et l'on peut se demander si cette mesure reflète véritablement la production d'acide ?

Pour l'acide lactique, nous pouvons conclure que la STH agit comme le fait l'AMPc ou ses dérivés d'où une interrelation possible entre ces deux composés. La théophylline a peut-être une fonction inhibitrice non sur la production mais sur la sortie de l'acide.

Le flux de la radioactivité liée au ^{14}C apportée par le D glucose est l'autre aspect des phénomènes de transport du sucre. La STH et la théophylline sont inactives mais leur association tend à une diminution de cette sortie, ce phénomène étant bien en rapport avec la faible augmentation de captation provoquée

par ce couple, une sortie diminuée a comme conséquence une radioactivité accrue dans la cellule, ainsi se trouve indirectement confirmée la faible action potentialisatrice de la théophylline sur l'action de la STH pour la captation du D glucose.

Le gaz carbonique n'est augmenté de manière nette qu'en une demi-heure par une dose de 10µg/ml de STH, les autres doses étant inactives. La théophylline ne semble pas avoir de rôle net ni de potentialisation, ni d'inhibition sur l'action de la STH. GOODMAN (1965) à propos des captations des sucres avait observé de fortes variations entre les diaphragmes. Nous avons évité cet écueil pour nos mesures de captation mais nous l'avons rencontré pour la production du CO_2. Le seul résultat significatif peut nous faire rapprocher l'action de la STH des résultats de KITABCHI et coll. (1970) qui montraient que l'AMPc augmente le gaz carbonique produit par des cellules adipeuses.

CONCLUSION

Les actions que nous venons de voir semblent en faveur d'une action de la STH passant par l'AMPc sur la captation des sucres et la production d'acide lactique et de gaz carbonique, mais la STH et la théophylline s'opposent sur la répartition du D glucose après son entrée dans la cellule. La STH augmente le glycogène et l'incorporation du D glucose dans le glycogène, la théophylline ne touche que peu le glycogène mais diminue l'incorporation du D glucose; il s'ensuit que leurs effets sont très différents. Nous avons constaté que l'action de la théophylline se rapproche assez de celle de l'AMPc ou de son dérivé dibutyrylé. La discussion sur ces répartitions est reportée au chapitre suivant qui traite des actions propres de la STH comparées a celles de l'AMPc et de son dérivé dibutyrylé.

C H A P I T R E V

ACTIONS EN TEMPS COURTS DE L'AMPc ET DU DIBUTYRYL AMPc SUR LA CAPTATION DES SUCRES ET LE METABOLISME DU D GLUCOSE PAR LE DIAPHRAGME ISOLE DE RAT HYPOPHYSECTOMISE

Des trois critères exigés par SUTHERLAND (1968) pour affirmer qu'une hormone utilise comme second messager l'AMPc, deux sont déjà vérifiés : l'augmentation du taux de l'AMPc par action de l'hormone et la potentialisation de l'action de l'hormone par la théophylline, il nous reste à vérifier le troisième critère, c'est-à-dire la reproduction de l'action hormonale par l'AMPc lui-même ou par son dérivé dibutyrylé. Il nous faut cependant faire quelques rappels sur l'action de l'AMPc sur le métabolisme glucidique.

L'injection d'AMPc provoque une hyperglycémie chez le chien (POSTERNAK et coll.,1962), chez le rat (NORTHROP et PARKS (1964), chez le lapin (LEVY et MICHEL-BER,1969) et chez la souris (BRON et ROUS,1971). Cependant PRELOT et DURAND (communication personnelle), chez des rattes adultes ne retrouvent pas cette hyperglycémie après injection de dibutyryl AMPc mais au contraire une hypoglycémie.

EDELMAN et EDELMAN (1966) montrent que sur le diaphragme isolé de rattes adultes, l'AMPc provoque une augmentation de la captation du D glucose, cependant inférieure à celle dûe à l'insuline (aux doses employées).

ALTZULER et coll. (1971) chez le chien entier ont réalisé des expériences complexes : après injection intraveineuse de dibutyryl AMPc et de glucose marqué à doses traceuses, ils observent une hyperglycémie d'origine hépatique mais aussi une captation tissulaire du D glucose à partir du plasma (cette captation est mesurée par la disparition de la radioactivité du plasma) mais cette captation est cependant inférieure à celle obtenue par une même hyperglycémie provoquée par une injection de D glucose, l'insulinémie étant égale durant ces deux sortes d'hyperglycémie (par injection de dibutyryl AMPc ou de D glucose). Pour ces auteurs le dibutyryl AMPc s'oppose directement ou indirectement à l'augmentation de la captation du D glucose par les cellules.

CHAMBAUT et coll. (1969) retrouvent les résultats d'EDELMAN avec l'AMPc alors qu'avec le dibutyryl AMPc ils obtiennent une inhibition de la captation du D glucose et sa transformation en glycogène par le diaphragme de rat normal.

SCHIMNEL et GOODMAN (1971) constatent que le dibutyryl AMPc peut avoir deux actions sur la captation du D glucose. A moins de 0,30mM, il provoque une augmentation de l'entrée de sucre comme le D xylose ou le D glucose dans le tissu adipeux et pour ce dernier sucre, l'accélération de sa transformation en gaz carbonique et triglycérides, à une concentration supérieure si la rentrée n'est pas affectée, la transformation est par contre inhibée.

Nous voyons que le sens de l'action de l'AMPc ou du dibutyryl AMPc peut être variable suivant les tests utilisés, les doses, les tissus, les espèces animales, l'âge et le sexe. Gardant le protocole opératoire précédemment décrit, nous avons cherché à comparer les effets directs de l'AMPc, du dibutyryl AMPc et de la STH sur la captation des deux sucres par le diaphragme isolé de rat hypophysectomisé.

De plus, comme au chapitre précédent nous avons vu que la STH et l'association STH + théophylline ne provoquent pas la même répartition du D glucose capté entre les deux fractions appelées "libre" et "incorporée" au glycogène, nous avons refait ces essais en absence de théophylline avec les deux nucléotides et avons comparé les actions de ces composés à celles de la STH.

TECHNIQUE

Les techniques sont celles décrites au chapitre II, les produits furent utilisés aux concentrations suivantes :

dibutyryl AMPc : 100µg/ml soit 0,21 mM
AMPc : 100µg/ml soit 0,30 mM
théophylline à 0,5 mg/ml STH à 20µg/ml

N.B.- Les résultats indiqués dans ce chapitre proviennent de 6 essais réalisés simultanément et si ces résultats ont été incorporés dans d'autres tableaux, l'inverse n'a pas été réalisé volontairement pour garder son homogénéité à l'essai.

RESULTATS

Le tableau XI montre les actions des trois corps en présence de théophylline sur la captation des deux sucres après 1 heure d'incubation et du dibutyryl et de la STH sur celle du seul D glucose en une demi-heure.

Le fait primordial est le parallélisme de captation des deux sucres provoquée par la STH et le dibutyryl en 1 heure. L'AMPc ne provoque de captation accrue que pour le D xylose. En une demi-heure, le dibutyryl AMPc n'a pas répondu lui non plus, mais nous pouvons constater que l'action de la STH est faible aussi. Le temps d'incubation n'est peut-être pas suffisamment long pour provoquer des écarts appréciables entre les témoins et les dosages.

TABLEAU XI

Action de la STH (20µg/ml), du dibutyryl AMPc (0,1mg/ml) et de l'AMPc (0,1mg/ml) sur la captation du ^{14}C D glucose (U) ou ^{14}C D xylose (U) en 1h, du ^{14}C D glucose (U) en 1/2h en présence de théophylline (0,5mg/ml) par le diaphragme isolé de rat hypophysectomisé (6 essais par expérience)

Composition du milieu d'incubation						Captation en pourcentage D/T		
Témoin			Dosage			Temps d'incubation: 1/2h	1h	
AMPc	dibut	STH	AMPc	dibut	STH	Sucre : D glucose	D xylose	D glucose
-	-	-	-	+	-	101,4 ± 4,4	112,6 ± 2,2**	112,6 ± 5,1**
-	-	-	+	-	-		114,1 ± 5,1*	106,7 ± 2,4
-	-	-	-	-	+	107,6 ± 5,9	114,9 ± 5,9*	116,2 ± 6,6**
-	+	-	+	-	-		101,4 ± 4,1	96,1 ± 6,5
-	+	-	-	-	+		101,0 ± 5,1	103,5 ± 5,2
+	-	-	-	-	+		100,7 ± 2,7	109,1 ± 5,8
-	+	-	-	+	+	96,6 ± 10,2		
-	-	+	-	+	+	100,2 ± 8,6		

* $P < 0,05$ ** $P < 0,01$

TABLEAU XII

Action de la STH (20µg/ml), du dibutyryl AMPc (0,1mg/ml) et de l'AMPc (0,1mg/ml) sur le CO_2 produit, la captation du ^{14}C D glucose (U), le glucose "libre" et le rapport entre le glucose "libre" et le glucose total capté par le diaphragme isolé de rat hypophysectomisé après une incubation d'une heure

Composition du milieu d'incubation						$^{14}CO_2$ produit en pourcentage D/T	Captation du D glucose en pourcentage D/T	Glucose "libre" en pourcentage D/T	Glucose "libre" / captation totale en pourcentage D/T
Témoin			Dosage						
STH	AMPc	Dibut	STH	AMPc	Dibut.				
-	-	-	+	-	-	(5) 124,0 ± 19,4	(6) 109,1 ± 5,9	(6) 111,6 ± 5,9	(6) 102,0 ± 7,1
-	-	-	-	+	-	(5) 162,0 ± 16,0*	(6) 107,6 ± 9,3	(6) 107,1 ± 5,0	(6) 109,7 ± 6,3
-	-	-	-	-	+	(5) 111,2 ± 24,0	(6) 101,9 ± 6,3	(6) 104,6 ± 5,4	(6) 110,8 ± 3,4*
+	-	-	-	+	-	(6) 130,7 ± 18,0	(6) 91,4 ± 9,8	(6) 96,1 ± 2,6	(6) 109,8 ± 9,4
+	-	-	-	-	+	(6) 95,7 ± 16,1	(6) 89,4 ± 12,3	(6) 94,9 ± 6,2	(6) 110,9 ± 7,7
-	+	-	-	-	+	(6) 83,0 ± 20,2	(6) 97,1 ± 5,6	(6) 99,5 ± 5,5	(6) 101,7 ± 3,2

( ) Nombre d'essais

* $p < 0,05$

TABLEAU XIII

Actions de la STH (20µg/ml), de l'AMPc (0,1mg/ml) et du dibutyryl AMPc (0,1mg/ml) sur le glycogène, le glucose incorporé dans le glycogène, l'activité spécifique du glycogène, les rapports glucose incorporé/glucose "libre" et glucose incorporé/glucose total capté, par le diaphragme isolé de rat hypophysectomisé après une heure d'incubation

Composition du milieu d'incubation						Glycogène en pourcentage D/T	Glucose incorporé en pourcentage D/T	Activité spécifique du glycogène en pourcentage D/T	Glucose incorporé / Glucose "libre" en pourcentage D/T	Glucose incorporé / Glucose total en pourcentage D/T
Témoin STH	AMPc	Dibut	Dosage STH	AMPc	Dibut					
-	-	-	+	-	-	(6) 121,2 ± 5,5*	(5) 155,0 ± 25,0	(5) 122,8 ± 14,9	(5) 139,7 ± 15,4	(5) 131,9 ± 11,4*
-	-	-	-	+	-	(6) 83,1 ± 6,1*	(6) 98,0 ± 18,0	(6) 120,4 ± 23,1	(6) 93,4 ± 13,3	(6) 98,8 ± 10,4
-	-	-	-	-	+	(5) 90,8 ± 6,4	(5) 71,3 ± 7,2*	(5) 74,4 ± 8,1	(5) 72,4 ± 9,2*	(5) 75,3 ± 8,5*
+	-	-	-	+	-	(6) 69,1 ± 6,0**	(5) 67,3 ± 10,6*	(5) 95,1 ± 12,8	(5) 71,6 ± 10,8	(5) 79,0 ± 8,2
+	-	-	-	-	+	(5) 79,0 ± 7,7*	(5) 53,3 ± 11,5*	(5) 60,8 ± 3,3**	(5) 56,7 ± 8,3*	(5) 60,3 ± 4,5*
-	+	-	-	-	+	(5) 113,1 ± 7,7	(5) 86,1 ± 7,3	(5) 73,6 ± 11,5	(5) 85,8 ± 6,0	(5) 81,0 ± 5,4*
STH			Théo + STH((1))			76,7 ± 5,8**	54,0 ± 4,4**	76,4 ± 5,9*	53,9 ± 4,0*	66,5 ± 5,3**

( ) Nombre d'essais * P < 0,05 ** P < 0,01

Glucose incorporé : radioactivité liée au glucose présente dans le glycogène
Glucose libre : radioactivité liée au glucose non incorporé dans le glycogène

((1)) Résultats déjà reportés au tableau X

Sur le tableau XII sont reportés la production de $^{14}CO_2$, la captation totale de D glucose, le glucose "libre" et le rapport entre cette fraction et le D glucose total capté, sous l'influence de la STH, de l'AMPc et du dibutyryl AMPc en absence de théophylline. Peu de résultats significatifs sont apportés par ces essais sinon l'augmentation du $^{14}CO_2$ par l'AMPc et du rapport glucose "libre"/glucose total sous l'influence du dibutyryl AMPc.

Par contre le tableau XIII, relatif au glycogène, au D glucose incorporé dans le glycogène et au rapport entre cette fraction et le glycogène ou le glucose "libre" ou le glucose "total", montre de nombreux résultats significatifs.

Par rapport à des témoins non traités, la STH augmente ces cinq paramètres, l'AMPc n'a que peu d'action (sauf une baisse du glycogène), le dibutyryl AMPc les abaisse tous. Dans tous ces tests la STH et le dibutyryl AMPc se comportent de façon nettement différente.

L'action générale de l'AMPc se situant entre celle de son dérivé dibutyrylé et celle de l'hormone, peu de différences significatives sont trouvées entre les actions de la STH et de l'AMPc d'une part, de l'AMPc et du dibutyryl AMPc d'autre part.

DISCUSSION

Chez les rattes le taux de STH n'augmente plus (dans l'hypophyse) après la puberté et est inférieur à celui du mâle (BIRGE et coll.,1967). CEHOVIC et coll. (1970) confirment le fait : ils montrent que l'AMPc ou le dibutyryl AMPc provoque une décharge de STH par l'hypophyse des rats mais cette action ne se produit pas chez les rattes. Cependant SCHALCH et REICHLIN (1966) infirment les précédents résultats en montrant que le taux plasmatique de STH des femelles est supérieur à celui des mâles. Cette STH est peut-être inactive (DICKERMAN et coll.,1972) comme le montre le

plateau pondéral que présente la ratte. Du point de vue de la STH active circulante, les rattes pourraient être considérées comme proches des rats hypophysectomisés. Ce fait explique-t-il les différences observées entre les auteurs à propos des captations des sucres par les muscles ?

EDELMAN et EDELMAN (1966) ont montré que le diaphragme de rattes adultes avait une captation du D glucose augmentée par l'AMPc. De même PRELOT et DURAND (communication personnelle) opérant sur les mêmes animaux observent que le dibutyryl AMPc n'a pas d'action hyperglycémiante comme l'avaient vu NORTHROP,LEVY et POSTERNAK sur divers animaux. PRELOT observe, au contraire, une hypoglycémie qui a peut-être pour origine une captation accrue des sucres par les muscles, effet non compensé par la glycogénolyse hépatique.

Rappelons que le dibutyryl AMPc peut avoir dans certains cas un effet inhibiteur sur la captation des sucres (CHAMBAUT et coll., 1969 - KITABCHI et coll.,1970 - ALTZULER et coll.,1971 - SCHIMMEL et GOODMAN,1971), l'AMPc ayant souvent des effets sinon opposés mais souvent peu nets par rapport à ceux obtenus avec le dibutyryl AMPc.

La STH, nous l'avons vu au chapitre III, augmente l'AMPc intracellulaire en temps court, la reproduction de l'effet de l'hormone par l'AMPc ou le dibutyryl AMPc confirme selon SUTHERLAND (1968) que l'AMPc peut être l'intermédiaire de l'action de la STH.

La faible action de l'AMPc peut avoir deux origines : une action de glycogénolyse peut s'opposer à l'entrée du D glucose; pour le D xylose les variations de la glycogénolyse sont sans influence sur sa pénétration d'où la captation supérieure de ce sucre par rapport à celle du D glucose ; l'autre origine de la faible action pouvant être la lente pénétration intracellulaire du nucléotide.

Les effets observés jusqu'ici semblent montrer que la STH et l'AMPc (ou plutôt son dérivé dibutyrylé) agissent de la même façon. Examinons les résultats sur la répartition du glucose dans la cellule, ces résultats doivent être divisés en deux parties : la première concerne la captation du D glucose et le glucose "libre" la deuxième concerne le glycogène, le glycogène "incorporé" et les rapports résultant de ces deux mesures.

Dans la première partie, les actions des trois corps ne sont pas très fortes sur la captation du D glucose et sont potentialisées par la théophylline. Ces trois corps augmentent un peu le glucose "libre". Une divergence apparaît cependant à propos du rapport glucose "libre"/glucose total, la STH a peu d'effet sur ce rapport mais les nucléotides l'augmentent ainsi que l'association théophylline + STH vis à vis dela STH(Tableau XII), cependant aucune différence significative ne peut être trouvée entre les nucléotides et la STH.

Les vraies divergences apparaissent dans la deuxième partie. Nous en profitons pour inclure ici les résultats transcrits sur le tableau X à propos des comparaisons entre l'association STH-théophylline et la seule STH, ces résultats étant très proches de ceux obtenus avec le dibutyryl AMPc.

La STH augmente la formation du glycogène, le glucose incorporé, les rapports glucose "incorporé"/glucose "libre", glucose "incorporé"/glucose total et l'activité spécifique du glycogène. L'AMPc a une action peu nette, mais le dibutyryl AMPc provoque l'action inverse de la STH, il s'ensuit que peu de différences significatives sont trouvées entre l'AMPc et la STH et entre les deux nucléotides, mais entre le dibutyryl ou l'association théophylline et STH, comparée à la STH seule, tous les paramètres cités plus hauts sont significativement différents.

Globalement la STH et les nucléotides (surtout le dibutyryl AMPc) ont la même action sur la captation du glucose, c'est-à-dire provoquent son entrée mais sa répartition se fait différemment ; la STH le transforme en glycogène tandis que les deux nucléotides et l'association STH + théophylline agissent dans le sens d'une augmentation du glucose "libre", plus directement utilisable pour les besoins de la cellule.

L'augmentation du glucose "libre" est faible en pourcentage et l'incorporation du glucose dans le glycogène fortement abaissée. Leur résultante peut cependant aboutir à une augmentation globale de la captation; cela vient du fait qu'en valeur absolue le glucose "libre" est plus abondant que le glycogène.

La STH a son action inversée par la théophylline sur la répartition du glucose dans la cellule. PAYNE et KOSTYO (1970) ont vu une action de ce genre mais sur la captation des acides aminés et leur incorporation dans les protéines. La STH seule augmente la captation des acides aminés et la synthèse protéique (HJALMARSON,1968c),en présence de théophylline l'action de la STH est abolie. Or BUTCHER et coll.(1971) ont montré que le glucagon augmente la captation hépatique des acides aminés, ADAMSON (1970) observe la même action avec le dibutyryl AMPc sur les os embryonnaires.

Les phénomènes sont à rapprocher: l'AMPc ou son dérivé peut augmenter la captation des acides aminés ou des sucres comme le fait la seule STH, mais cette hormone en présence de théophylline voit son action inversée pour la répartition du D glucose ou annulée pour la synthèse protéique. La captation des acides aminés peut être annulée par la théophylline car la majeure partie de ces acides sert à la synthèse protéique, l'arrêt de cette dernière annule la première action; pour le sucre, la diminution de son incorporation dans le glycogène retentit peu sur la captation.

L'inefficacité relative de l'AMPc tient à sa non pénétration et au fait que les expériences sur la répartition du glucose ayant lieu en absence de théophylline, le nucléotide est plus vite dégradé que son homologue dibutyrylé.

L'effet sur la captation par le dibutyryl AMPc pourrait, semble-t-il, être plus fort si la glycogénolyse était inhibée, le gradient de concentration intra-extra cellulaire serait alors diminué d'où une captation accrue du sucre. Nous avons vu que le dibutyryl AMPc et l'association STH-théophylline agissaient de même sur la glycogénolyse; ainsi se trouve expliquée la faible potentialisation de la captation du D glucose par cette association et la potentialisation pour le D xylose.

CONCLUSION

La STH, l'AMPc et le dibutyryl AMPc en temps bref et en présence de théophylline augmentent la captation des sucres par le diaphragme isolé de rat hypophysectomisé.

Ces corps n'ont cependant pas la même action sur l'incorporation dans le glycogène du D glucose capté : la STH augmente cette incorporation, le dibutyryl AMPc la diminue, l'AMPc est peu actif.

C H A P I T R E V I

ACTIONS DU METHYL 2 IMIDAZOLE (M 2 I)

Au chapitre III nous avons vu l'action de la STH et de la théophylline sur la captation du D glucose ou du D xylose et leurs effets sur la formation de l'AMPc.

Nous avons utilisé un activateur de la phosphodiestérase pour réaliser les expériences inverses de celles avec la théophylline. Parmi les dérivés de l'imidazole susceptibles d'activer la phosphodiestérase, nous avons choisi le methyl 2 imidazole.

Les premiers travaux relatifs à l'imidazole datent du début des découvertes sur l'AMPc et sont dûs à SUTHERLAND et RALL (1958), BUTCHER et SUTHERLAND (1962), GOODMAN (1969) qui ont montré son action activatrice sur la phosphodiestérase, inverse de la théophylline. KUKOVETZ et POECH (1967) observent que l'imidazole réduit les effets des methylxanthines sur la contractibilité cardiaque et sur la phosphorylase. WILKENFIELD et LEVY (1969), sur l'iléon de lapin, montrent que l'imidazole réduit la réponse à l'isoproterenol (agent inhibiteur β adrénergique), action potentialisée par la théophylline. La TSH et l'AMPc augmentent la libération de radioiode par la thyroïde, cet effet étant annulé par l'imidazole (PISAREV et coll., 1971). Pour HEPP et coll.(1970) l'imidazole bloque les effets de l'adrénaline sur le tissu adipeux

Les travaux relatifs à l'action des dérivés de l'imidazole sur la phosphodiestérase sont encore moins nombreux; KLEISBAUER et coll. (1968) ont étudié les effets de différents corps à noyau imidazole sur la lipolyse spontanée du tissu adipeux épidydimaire de rat et sur celle induite par la théophylline. Nous résumons ces travaux dans le tableau suivant :

Influence de différents dérivés de l'imidazole sur la lipolyse spontanée et la lipolyse induite par la théophylline (d'après KLEISBAUER et coll.,1968)

	lipolyse spontanée	lipolyse induite par la théophylline
Histamine	+ 40 %	- 27 %
Imidazole	- 10 %	- 20 %
Methyl 1 imidazole	- 10 %	- 10 %
Methyl 2 imidazole	- 30 %	- 30 %
Histidine	0	0

\+ augmentation de la lipolyse

\- diminution de la lipolyse

Nous voyons que le methyl 2 imidazole possède la plus forte action inhibitrice sur les deux types de lipolyse.

Plus récemment, NAKANO et coll. (1970) ont étudié les actions de trois de ces corps sur les effets lipolytiques de la noradrénaline, de l'ACTH, de la théophylline et du dibutyryl AMPc, travaux que nous résumons en un autre tableau.

Influence de trois dérivés de l'imidazole
sur la lipolyse induite par l'ACTH, la noradrénaline
la théophylline et le dibutyryl AMPc (d'après NAKANO et coll. 1970)

	ACTH	Noradrénaline	Théophylline	Dibutyryl AMPc
Imidazole	-	-	-	0
Méthyl 1 imidazole	-	0	0	0
Méthyl 2 imidazole	-	0	0	0

\- action inhibitrice

0 aucune action

De l'avis même de ces derniers auteurs, il n'y a pas d'explications satisfaisantes quant à la divergence d'action de ces différents dérivés sur la lipolyse ainsi induite. Nous pouvons observer la différence entre ces résultats sur la lipolyse induite par la théophylline : pour KLEISBAUER et collaborateurs, les trois dérivés sont actifs, pour NAKANO et collaborateurs, seul l'imidazole l'est.

Malgré les résultats négatifs de NAKANO et collaborateurs, nous avons utilisé le méthyl 2 imidazole beaucoup plus actif que son chef de file, d'après KLEISBAUER, pour réaliser des essais d'inhibition de l'action de la STH sur la captation du D xylose et du D glucose et la formation d'AMPc par le diaphragme isolé de rat hypophysectomisé.

Les résultats trouvés lors de ces essais nous ont conduit à tester l'imidazole et le méthyl 1 imidazole. Leurs actions seront étudiées lors du chapitre relatif au rôle des sequestrants du calcium. Dans la discussion qui suivra, nous analyserons les actions de tous ces corps en fonction de la teneur en calcium des bains d'incubation.

TECHNIQUE

Les techniques habituelles de mesures de captation des sucres sont utilisées ainsi que celles de dosage de l'AMPc. Le M 2 I est employé à la dose de 10mg/ml, dose couramment utilisée par les différents auteurs.

RESULTATS

Le tableau XIV et la figure 10 montrent que le M 2 I provoque en une demi-heure, une captation accrue du D glucose et un départ très accéléré de la radioactivité tritiée ; si l'AMPc formé est diminué, le rapport R est au contraire augmenté par ce corps.

La troisième colonne montre que la STH en milieu M 2 I augmente la libération de la radioactivité, diminue l'AMPc formé et le gaz carbonique, mais le rapport R est cependant supérieur à 100 p.cent.

Dans la quatrième colonne de ce tableau, nous voyons que le M 2 I en milieu STH entraîne une diminution de l'AMPc formé de manière très nette, mais le rapport R et la captation du glucose restent élevés.

Sur le tableau XV, le M 2 I en une heure augmente la captation des deux sucres et surtout du D xylose, annule l'effet de la STH sur le glucose et inverse celui sur le D xylose. Le M 2 I seul ou en présence de STH abaisse le taux d'AMPc (dosé selon BROOKER) tandis que la STH seule ou en présence de M 2 I accroît la teneur intracellulaire en AMPc (les dosages du nucléotide ont été effectués en même temps que la captation du D glucose).

TABLEAU XIV

Action de la STH (5µg/ml) et du méthyl 2 imidazole (10mg/ml) sur la captation du ^{14}C D glucose (U), la radioactivité tritiée retenue "Adénine", l'AMPc formé à partir d'Adénine $^{3}H_2$, le rapport "R" et la production de $^{14}C\ O_2$ par le diaphragme isolé de rat hypophysectomisé après une 1/2 heure d'incubation (6 essais par expérience)

	Composition du milieu d'incubation							
	Témoin O	Dosage STH	Témoin O	Dosage M2I	Témoin M2I	Dosage M2I+STH	Témoin STH	Dosage M2I+STH
Adénine retenue en cpm/100mg de tissu	431600 ± 33900	546600 ± 79700	431600 ± 33900	175400 ± 13800	175400 ± 13800	97600 ± 7700	546600 ± 79700	97600 ± 7700
Adénine retenue en pourcentage D/T	126,6		40,6**		55,6**		17,8**	
AMPc formé β en cpm/100mg de tissu	26420 ± 1350	39170 ± 4720	26420 ± 1350	17580 ± 2070	17580 ± 2070	10120 ± 1770	39170 ± 4720	10120 ± 1770
Pourcentage d'AMPc formé S/T	148,2*		66,5**		57,6**		25,8**	
Pourcentage de transformation de l'adénine en AMPc	6,31 ±0,57	7,55 ± 0,79	6,31 ± 0,37	9,98 ±0,88	9,98 ±0,88	11,17 ± 0,88	7,55 ± 0,79	11,17 ± 0,88
"R"	119,6		158,1*		111,9		147,9	
Pourcentage de captation du glucose D/T	113,6 ± 3,4**		129,5 ± 2,4**		108,4 ± 1,4**		124,0 ± 3,5**	
$^{14}CO_2$ produit en pourcentage	172,0		65,1		60,2		22,7	

* $P < 0,05$ ** $P < 0.01$

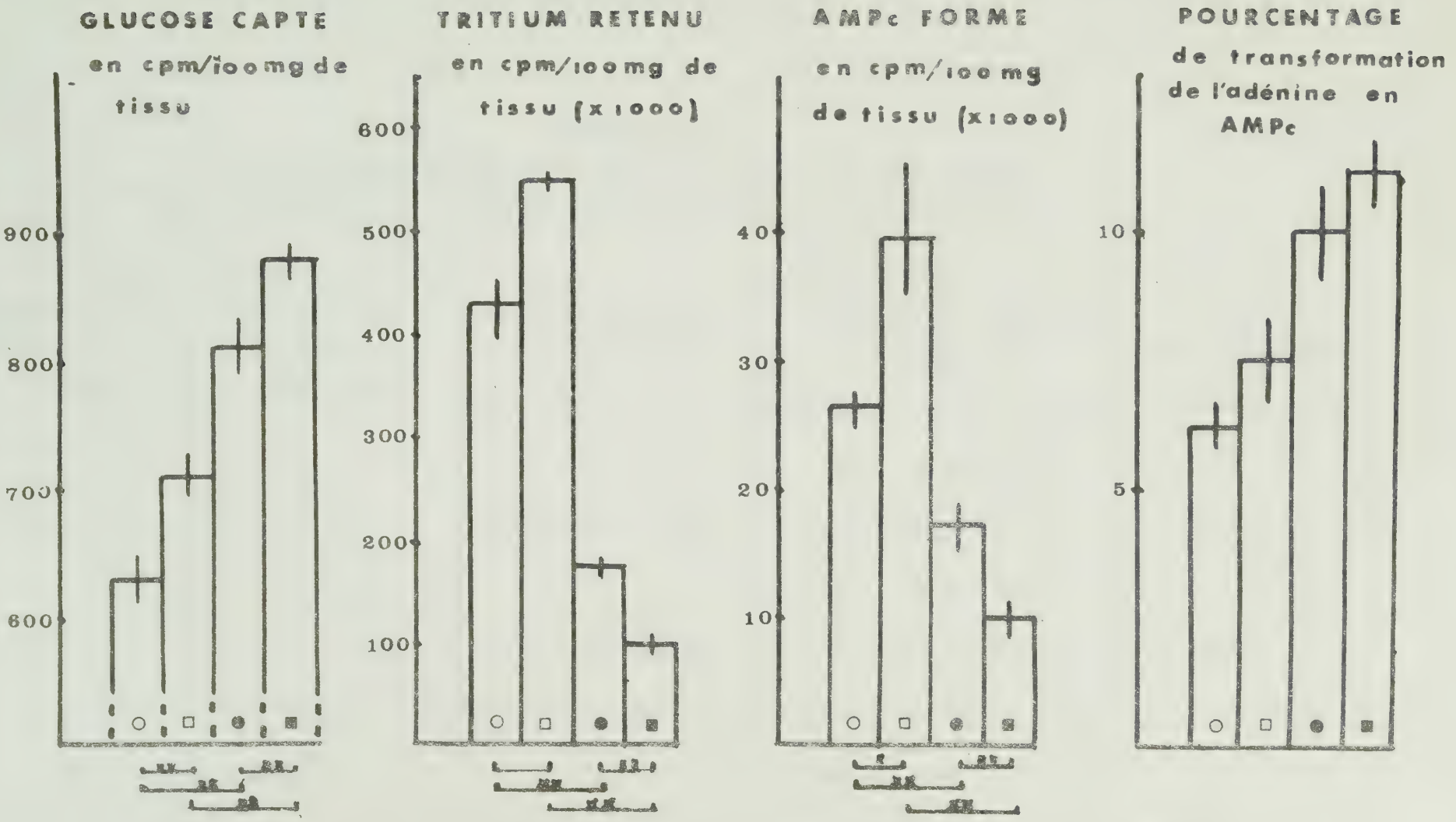


Figure 10 - ^{14}C D glucose (U) capté, tritium retenu, AMPc formé et pourcentage de transformation de l'adénine 2 H_3 en AMPc par le diaphragme isolé de rat hypophysectomisé témoin ○ en présence de STH (5µg/ml) □ , de méthyl 2 imidazole (10mg/ml) ● et de l'association des deux corps ■ en une demi-heure d'incubation (6 essais par expérience)

x P 0,05 xx P 0,01

TABLEAU XV

Influence de la STH (5µg/ml) et du méthyl 2 imidazole (M2I, 10mg/ml) sur la captation du ^{14}C D xylose (U), du ^{14}C D glucose (U) et la formation de l'AMPc dosé selon la méthode de BROOKER (1968) après une heure d'incubation

Composition du milieu d'incubation				Captation du D xylose en pourcentage D/T	Captation du D glucose en pourcentage D/T	AMPc en pourcentage D/T
Témoin		Dosage				
M2I	STH	M2I	STH			
-	-	-	+	(6) 105,2 ± 5,3	(6) 116,0 ± 4,2**	160,4
-	-	+	-	(6) 134,5 ± 5,3**	(12) 105,7 ± 2,6	77,4
-	+	+	+		(6) 91,8 ± 5,1	52,5
+	-	+	+	(6) 87,6 ± 2,8**	(12) 100,1 ± 3,3	100,0

( ) Nombre d'essais

** $P < 0,01$

DISCUSSION

Une divergence fort nette entre l'AMPc formé et la captation du D glucose apparaît en une demi-heure, mais les mouvements transmembranaires semblent activés par le dérivé de l'imidazole comme le prouve la grande captation du sucre et le flux sortant de tritium contenu dans la cellule.

Le M 2 I abaisse le taux d'AMPC d'une manière très nette et nous retrouvons l'action déjà décrite par SUTHERLAND - RALL à propos de l'activation de la phosphodiestérase par l'imidazole. L'AMPc restant dans les cellules après action du dérivé imidazolé n'est plus que de 70 p.cent de celui des témoins (en 1/2h ou 1h) quelle que soit la méthode de dosage utilisée.

Mais cet effet est-il dû réellement à une activation de la phosphodiestérase ? L'effet de l'imidazole sur le niveau de l'AMPc des cellules n'avait pas été mesuré à ce jour, comme le faisait déjà remarquer ROBISON et coll. en 1971.La baisse observée de l'AMPc dans nos expériences semble dûe plus à une sortie de l'AMPc,ou de ses précurseurs, qu'à une action activatrice sur la phosphodiestérase; le rapport "R" que nous calculons montre en fait une inhibition de la phosphodiestérase. "R" représente le rapport de transformation de l'adénine en AMPc entre les fragments témoins et les traités, il est augmenté soit par activation de la cyclase (action de la STH) ou inhibition de la phosphodiestérase (action de la théophylline). Nous constatons ici, une profonde divergence entre "R" et l'AMPc dont nous ne pouvons guère expliquer l'origine (ce problème sera de nouveau discuté après avoir étudié les actions du calcium).

Autre paradoxe, l'AMPc est abaissé mais la captation des sucres est augmentée par le M 2 I. Nous avons vu au chapitre V que l'AMPc ou son dérivé dibutyrylé favorisent la captation des sucres. Cette divergence n'a peut-être pas pour origine les variations d'AMPc de la cellule, mais une différence de concen-

tration osmolaire des bains d'incubation. Alors que pour les essais portant sur les effets du calcium, de ses sequestrants, du potassium ou du magnésium nous respections l'osmolarité en ajoutant aux bains privés de l'ion étudié des quantités équivalentes de NaCl, il n'en fut pas de même pour ces essais.

Selon KOHN (1971) l'augmentation de la force ionique du bain d'incubation provoque une augmentation de la captation du sucre. Nous avons réalisé l'expérience suivante : des quarts de diaphragme de rats normaux sont mis à incuber avec du glucose dissous; pour le bain nº1, dans du Krebs normal; pour le bain nº2 dans du Krebs + 9g/l de NaCl ; pour le bain nº3 dans du Krebs + 18g/l de NaCl et pour le bain nº4 27g/l de NaCl sont ajoutés au Krebs normal. Les comparaisons de captation du glucose entre les diaphragmes sont de

+ 27 % entre les bains nº 2 et 1
+ 37 % " " " nº 3 et 1
+ 29,8 % " " " nº 4 et 1

Nous voyons qu'une augmentation de la force ionique provoque une captation accrue du glucose (sauf pour le bain nº 4 qui est peut-être trop concentré).

Le poids moléculaire du M 2 I est de 82, il est utilisé à raison de 10mg/ml soit 122 mM. La différence entre les bains 1 et 2 est de 155mM. Pour les captations des sucres, deux phénomènes inverses peuvent donc s'opposer : d'une part, l'osmolarité et d'autre part, la diminution de l'AMPc, le résultat tendrait vers une augmentation de la captation (ce phénomène, sans être exclu, doit être fort limité pour la théophylline qui a un poids moléculaire de 198 et est employée à la dose de 0,5mg/ml, soit 2,5mM).

Le CO_2 produit, quelles que soient les associations entre la STH et le M 2 I, suit de très près les variations de l'AMPc, le M 2 I réduit donc le métabolisme du glucose par un mécanisme où peut être impliqué l'AMPc.

L'idée de départ de ces essais était d'annuler, par un activateur de la phosphodiestérase, l'augmentation de captation des sucres provoquée par la STH. Nous constatons non une annulation, mais dans le cas du xylose, une inversion de l'action de la STH sous l'effet du méthyl 2 imidazole. Sur le tableau XVI sont reportés dans la première colonne, les rapports en pourcentage de captation des sucres entre témoin et STH, dans la seconde les mêmes rapports en présence de M 2 I, la troisième colonne indique la différence entre ces pourcentages.

TABLEAU XVI

Différences de captation du xylose ou du glucose par la STH sous l'influence du méthyl 2 imidazole

Sucre testé	Temps d'incubation	STH/Témoin	M 2 I + STH/M 2 I	Différence
Xylose	1 heure xx	105,2	87,6	- 17,6
Glucose	1 heure xx	116,0	100,1	- 15,9
Glucose	1/2 heure x	115,9	108,4	- 7,5

x résultat tiré du tableau XXV

xx résultat tiré du tableau XXVI

Nous voyons que l'association avec le M 2 I entraîne une inversion de l'action de la STH. La même inversion peut être notée à propos de la radioactivité tritiée gardée par le tissu : pour la STH seule, elle est de 126,6 p.cent de celle du témoin; en présence de M 2 I, la STH la réduit à 56 p.cent de celle du témoin, soit une différence de 70 p.cent. Le gaz carbonique dans les mêmes conditions accuse une baisse très nette, passant de 172 p.cent avec la STH à 60,2 p.cent en présence de M 2 I et de

STH , les mêmes comparaisons pour l'AMPc sont de 146 p.cent et 58 p.cent (Tableau XIV).

Les captations des sucres, le CO_2 produit, l'AMPc produit et le flux du tritium sont diminués par la STH en présence de M 2 I alors qu'une annulation pure et simple était attendue.

La STH augmente la captation des sucres et celle des acides aminés (voir Introduction) mais il n'est pas exclu que l'hormone puisse augmenter l'entrée du méthyl 2 imidazole dans la cellule. Le M 2 I étant plus abondant dans le milieu intracellulaire,à cause de la STH, ralentirait l'entrée des sucres par trois mécanismes : moins grande différence d'osmolarité entre les milieux intra et extracellulaires, réduction du métabolisme du glucose et baisse de l'AMPc par une plus grande activation de la phosphodiestérase.

CONCLUSION

Les actions du méthyl 2 imidazole nous ont conduit à des résultats inattendus comme l'inversion de l'action de la STH sur la formation de l'AMPc, de la production de CO_2 et la captation des sucres. Le méthyl 2 imidazole étant un sequestrant du calcium, après avoir étudié les actions de cet ion, nous reverrons d'autres actions du M 2 I en fonction de la teneur en calcium des bains d'incubation.

C H A P I T R E V I I

ACTIONS DE LA TSH ET DE L'ACTH SUR LA CAPTATION DU GLUCOSE

La STH que nous utilisons pour nos essais n'est pas pure et contient principalement comme impureté de la"Thyroïd -Stimulating Hormone" (TSH) (PRELOT et coll., 1971), nous avons donc voulu vérifier que cette hormone, même sous forme de traces, ne provoquait pas l'action que nous attribuions à la STH; nous avons aussi vérifié qu'une autre hormone hypophysaire, l'ACTH, n'en était pas responsable.

La TSH provoque une augmentation de l'oxydation du glucose par les coupes de thyroïde de chien ou de rat (mais non de boeuf), le dibutyryl AMPc a la même action (PASTAN et MACCHIA, 1967 - ZOR et coll., 1968). La TSH ou l'ACTH sont capables d'augmenter le taux d'AMPc de la thyroïde ou de la corticosurrénale, d'où cette vérification.

RESULTATS

Sur le tableau XVII sont reportés les résultats des expériences réalisées selon les conditions habituelles (milieu de Krebs normal, théophylline 0,5 mg/ml, incubation de 1 heure) avec de la TSH "ENDO" à trois doses 0,001, 0,01 et 0,1 unité HEYL et LAQUEUR

TABLEAU XVII

Action de la TSH à diverses doses, de l'ACTH (0,025UI/ml) et de la STH (20µg/ml) en présence de théophylline (0,5mg/ml) sur la captation de ^{14}C D glucose (U) par le diaphragme isolé de rat hypophysectomisé (durée d'incubation : 1 heure)

Composition du milieu d'incubation							Captation du D glucose en pourcentage D/T	
Témoins			Dosage					
STH	TSH	ACTH	STH	TSH	ACTH			
-	-	-	-	+°	-	(11)	104,2 ± 2,5	
-	-	-	-	+°°	-	(6)	102,8 ± 3,2	
-	-	-	-	+°°°	-	(6)	100,8 ± 1,3	
-	-	-	+	-	-	(5)	116,2 ± 2,5**	
-	-	-	-	-	+	(5)	98,8 ± 5,6	
-	+°	-	+	-	-	(5)	114,8 ± 3,9*	
-	-	+	+	-	-	(5)	119,0 ± 6,5**	

° TSH 0,1 U HL/ml °° TSH 0,01 U HL/ml °°° TSH 0,001 U HL/ml

( ) Nombre d'essais * $P < 0,05$ ** $P < 0,01$

par millilitre, soit environ 0,00011, 0,0011 et 0,011 UI/ml), de l'ACTH "CHOAY" (0,025 UI/ml et de la STH (20 µg/ml). D'après les résultats de PRELOT et coll. (1971), la dilution de la STH représente 0,0062 UI de TSH par millilitre, soit environ 6 fois la deuxième dose testée de TSH et la moitié de la troisième.

Aucune dose de TSH, ni d'ACTH n'est active sur la captation du glucose. Il existe des différences significatives entre l'action de la STH et celle du témoin, de la STH et de la TSH (à toutes doses), de la STH et de l'ACTH.

DISCUSSION

Les actions de la TSH sur la thyroïde (GILMAN et RALL, 1968a-b) et de l'ACTH sur la corticosurrénale (GRAHAME-SMITH et coll.,1967) ont pour médiateur l'AMPc.

Pourquoi ces hormones n'ont-elles pas d'action sur la captation du glucose par le diaphragme isolé de rat hypophysectomisé ? Les récepteurs cellulaires de la thyroïde ou de la corticosurrénale sont spécifiques d'une hormone, au contraire, les récepteurs des cellules adipeuses le sont peu : l'ACTH, la TSH, la STH agissent sur l'adenylcyclase du tissu adipeux et augmentent la lipolyse chez le rat hypophysectomisé (SWISLOCKI,1970).

L'essai que nous avons effectué montre que les récepteurs musculaires possèdent une certaine spécificité puisqu'ils sont sensibles à la STH mais non à la TSH ou à l'ACTH, ce qui expliquerait l'absence d'action de ces deux hormones sur la captation du glucose.

La TSH ou l'ACTH à des doses supérieures à celles pouvant être présentes dans la STH employée n'influencent pas la captation du D glucose par la diaphragme isolé de rat hypophysectomisé.

DISCUSSION GENERALE DE LA PHASE A

Peut-on matérialiser un rapport entre l'AMPc et la STH sur la captation des sucres ?

Des résultats précédents il ressort, dans un certain nombre de cas, une relation que nous ne pouvons cependant généraliser comme le montre la répartition du glucose une fois capté et les résultats fournis avec le méthyl 2 imidazole.

Nous avons supposé que l'ordre des évènements était d'abord une augmentation de l'AMPc puis une captation accrue des sucres. L'ordre peut-il être inversé ? Par exemple, les sucres entrants peuvent-ils augmenter l'AMPc ? PETERKOSKY et GAZDAR (1971) ont montré sur Escherichia coli un "effet glucose" sur l'AMPc; le nucléotide produit par les bactéries augmente avec la concentration en glucose du bain d'incubation. Le glucose peut donc induire la synthèse d'AMPc (peut-être en augmentant l'ATP). Cependant, nous savons que la captation est favorisée par la STH tant pour de nombreux sucres que pour des acides aminés utilisables ou non : il ne semble pas que ces dernièrs puissent modifier l'AMPc intracellulaire, lequel doit au contraire favoriser leur entrée.

Certains auteurs comme MOSKOWITZ et FAIN (1970) ont vu que l'hormone somatotrope augmente l'AMPc du tissu adipeux de rat, Mac MANUS et WHITFIELD (1969), WHITFIELD et coll. (1971) observent que la STH, pour induire la prolifération des thymocytes, augmente l'AMPc. De ces quelques travaux, il semble donc que la STH, bien que classée parmi les hormones morphogénétiques (MOREL,1970) puisse être active sur l'adénylcyclase de certains tissus.

La seule objection peut venir de la répartition du glucose une fois capté mais cette divergence est-elle réelle ? SCHIMMEL et GOODMAN (1971) ont vu que le dibutyryl AMPc agissait différem-

ment suivant les doses employées, la STH seule, pourrait être considérée équivalente à une "faible" dose d'AMPc et n'augmenter que la captation des sucres, la STH en présence de théophylline serait assimilée à une "forte" dose d'AMPc et pourrait activer la phosphorylase d'où l'inversion d'action observée à propos du glycogène.

TROISIEME PARTIE

ACTIONS DE LONGUES DUREES DE LA STH

C H A P I T R E V I I I

ACTIONS DE LA STH SUR LA CAPTATION DES SUCRES PAR LE DIAPHRAGME ISOLE DE RAT HYPOPHYSECTOMISE APRES 3 OU 6 HEURES D'INCUBATION

La deuxième phase de l'action de la STH que nous appellons "phase B" correspond à l'effet diabétogène de cette hormone. Il y a diminution de l'utilisation du glucose par les cellules périphériques, augmentation du flux hépatique de glucose et une lipolyse accrue durant cette phase. Ces effets furent observés par PARK et coll. (1952), AHREN et HJALMARSON (1967), ARVILL et HJALMARSON (1968), HJALMARSON (1967 a-b, 1968a-b-c) et GOODMAN (1967b) sur le diaphragme de rat, par RANDLE et MORGAN (1962) sur le coeur perfusé et par GOODMAN (1963,1965 a-b, 1968 a-b-c-d,1969c) sur le tissu adipeux.

L'annulation de l'effet initial de la STH n'est pas en relation avec un effet antiinsuline puisque FRANKSON et coll. (1961) observent une élévation de l'insulinémie lors de cette phase et que CAMPBELL et RASTOGI (1967) remarquent que cette insuline est utilisée.

Une dose unique de STH injectée peu de temps avant l'essai provoque cette séquence biphasique, une dose quotidienne plusieurs jours avant l'essai annule l'effet initial d'hypercaptation des sucres par les tissus.

HJALMARSON observe ces effets, in vitro, sur le diaphragme de rat hypophysectomisé et il en conclue que :

- L'effet est valable pour des doses de 0,1 à 100 µg/ml de STH.
- L'inhibition n'est pas dûe à un changement de la composition du bain d'incubation.
- Une modification chimique de la STH n'est pas à l'origine de sa perte d'activité.
- Cette perte d'activité n'est pas dûe à la formation d'un inhibiteur sérique ou à la mise en jeu d'une glande.

Quelles peuvent être les relations entre l'AMPc et cette phase d'inactivité de la STH ?

L'administration de STH à doses élevées au chien pendant plusieurs jours provoque une augmentation de la production de glucose par le foie (ATZULER,1968); l'adrénaline et le glucagon ont la même action mais en un temps bref. Cette tendance à l'hyperglycémie peut expliquer en partie l'effet diabétogène de la STH.

Les adipocytes de rats hypophysectomisés sont plus sensibles à l'action lipolytique d'autres hormones (comme l'adrénaline) après action de la STH, cette sensibilisation n'est pas immédiate mais demande un délai de 1 à 2h environ (FAIN,1968), temps qui serait nécessaire soit à une synthèse d'adénylcyclase, soit à une inhibition de la phosphodiestérase. Cette sensibilisation peut cependant passer par la synthèse de la lipase par la STH, l'hormone pouvant ainsi n'avoir aucun effet sur l'AMPc.

La STH, après un certain laps de temps, pourrait provoquer une formation accrue d'AMPc, tant au niveau du foie, qu'à celui du tissu adipeux : nous avons cherché à savoir si l'activité de la STH sur la captation des sucres par le diaphragme faisait suite à une augmentation de l'AMPc intracellulaire.

RESULTATS

Sur les tableaux XVIII et XIX sont reportés l'action de la STH et de la théophylline sur la captation du D xylose ou du D glucose et l'effet de l'hormone sur l'AMPc en 3 ou 6 heures. La théophylline en milieu STH pour le xylose, la STH en milieu théophylline pour le glucose, réduisent en 3 heures la captation de ces sucres.

La STH en 6 heures provoque une diminution de l'AMPc mais la radioactivité tritiée retenue variant dans le même sens, le rapport "R" n'est pas modifié.

Les tableaux XX et XXI et les figures 11 et 12 montrent l'effet des mêmes corps sur la production d'acide lactique dans le bain d'incubation, la sortie de ^{14}C en 1,3 et 6 heures et le glucose "incorporé" dans le glycogène à la fin de la 6ème heure d'incubation.

La figure 13 représente l'évolution de la captation des deux sucres dans le temps sous l'influence de la STH.

Sur le tableau XXII nous voyons que les effets du M 2 I sur les captations varient avec le temps et selon les sucres. La STH en milieu M 2 I ne provoque pas une captation des sucres bien que l'AMPc reste élevé. Le M 2 I en 3 ou 6 heures abaisse l'AMPc mais avec la STH il est inactif.

La figure 14 fait ressortir les variations de captation des deux sucres dans le temps.

DISCUSSION

La STH seule n'a pas d'action sur la captation des deux sucres en 3 heures, ni sur l'AMPc et "R". En 6 heures, l'AMPc

TABLEAU XVIII

Action de la STH, de la théophylline sur la captation du ^{14}C D xylose (U), du ^{14}C D glucose (U) et la formation de l'AMPc par les diaphragmes isolés de rats hypophysectomisés après une incubation de 3 heures

Composition du milieu d'incubation				Captation du D xylose en pourcentage D/T	Captation du D glucose en pourcentage D/T	AMPc formé en pourcent D/T	Adénine retenue en pourcentage D/T	"R"
Témoin STH	Théo	Dosage STH	Théo					
-	-	+[1]	-	(12) 102,8 ± 3,5	(22) 99,2 ± 2,0	139,0[4]		
						110,1[5]	113,1	89,9
-	-	+[2]	-		(12) 99,7 ± 3,0	105,7[5]	76,9	84,1
-	-	-	+	(6) 96,7 ± 6,3	(6) 110,0 ± 5,7			
-	+	+[1]	+		(6) 86,1 ± 3,5**			
+[1]	-	+[1]	+	(6) 85,4 ± 3,1**	(6) 94,9 ± 4,6			
-	+	+[3]	+	(6) 106,1 ± 1,5	(6) 100,4 ± 1,7			

Théophylline 0,5mg/ml

1 STH 5µg/ml

2 STH 10 µg/ml

3 STH 20µg/ml

4 AMPc dosé selon la méthode de BROOKER

5 AMPc dosé selon la méthode de KUO

( ) Nombre d'essais

** P < 0,01

TABLEAU XIX

Action de la STH, de la théophylline (0,5mg/ml)
sur la captation du ^{14}C D xylose (U), du ^{14}C D glucose (U) et la formation de l'AMPc
par les diaphragmes isolés de rats hypophysectomisés après une incubation de 6 heures

Composition du milieu d'incubation				Captation du D xylose en pourcentage D/T	Captation du D glucose en pourcentage D/T	AMPc formé en pourcent D/T	Adénine retenue en pourcentage D/T	"R"
Témoin STH	Théo	Dosage STH	Théo					
-	-	+[1]	-	(12) 102,3 ± 2,8	(10) 106,6 ± 2,7	(9) 56,7[3]	(9) 67,2*	(9) 107,0
					(12) 101,8 ± 3,8	(12) 79,5[4]		
-	-	-	+	(6) 104,6 ± 4,0	(6) 103,4 ± 4,4			
-	+	+[1]	+	(6) 92,5 ± 2,5	(12) 97,3 ± 1,7			
+[1]	-	+[1]	+	(6) 94,0 ± 4,2	(6) 94,9 ± 1,9			
-	+	+[2]	+	(6) 101,9 ± 3,0	(6) 96,9 ± 2,1			

1 STH 5µg/ml

2 STH 20µg/ml

3 AMPc dose selon la méthode de KUO

4 AMPc dose selon la méthode de BROOKER

( ) Nombre d'essais

* $P < 0,05$

TABLEAU XX

Production d'acide lactique par le diaphragme de rat hypophysectomisé sous l'influence de la STH (10µg/ml) et de la théophylline (0,5mg/ml) en 1h, 3h et 6h d'incubation. (6 essais par expérience)

Composition du bain d'incubation				Acide lactique produit dans le bain d'incubation en pourcentage D/T		
Témoin		Dosage		1h	3h	6h
Théo	STH	Théo	STH			
-	-	-	+	156,8 ± 13,6**	118,3 ± 8,2*	134 ± 16,5
-	-	+	-	117,0 ± 6,7	107,7 ± 10,3	137,9 ± 24,5
-	+	+	+	92,9 ± 5,0	105,5 ± 18,1	103,2 ± 14,9
+	-	+	+	126,6 ± 15,8	125,5 ± 29,0	100,7 ± 16,5

* $P < 0,05$ ** $P < 0,01$

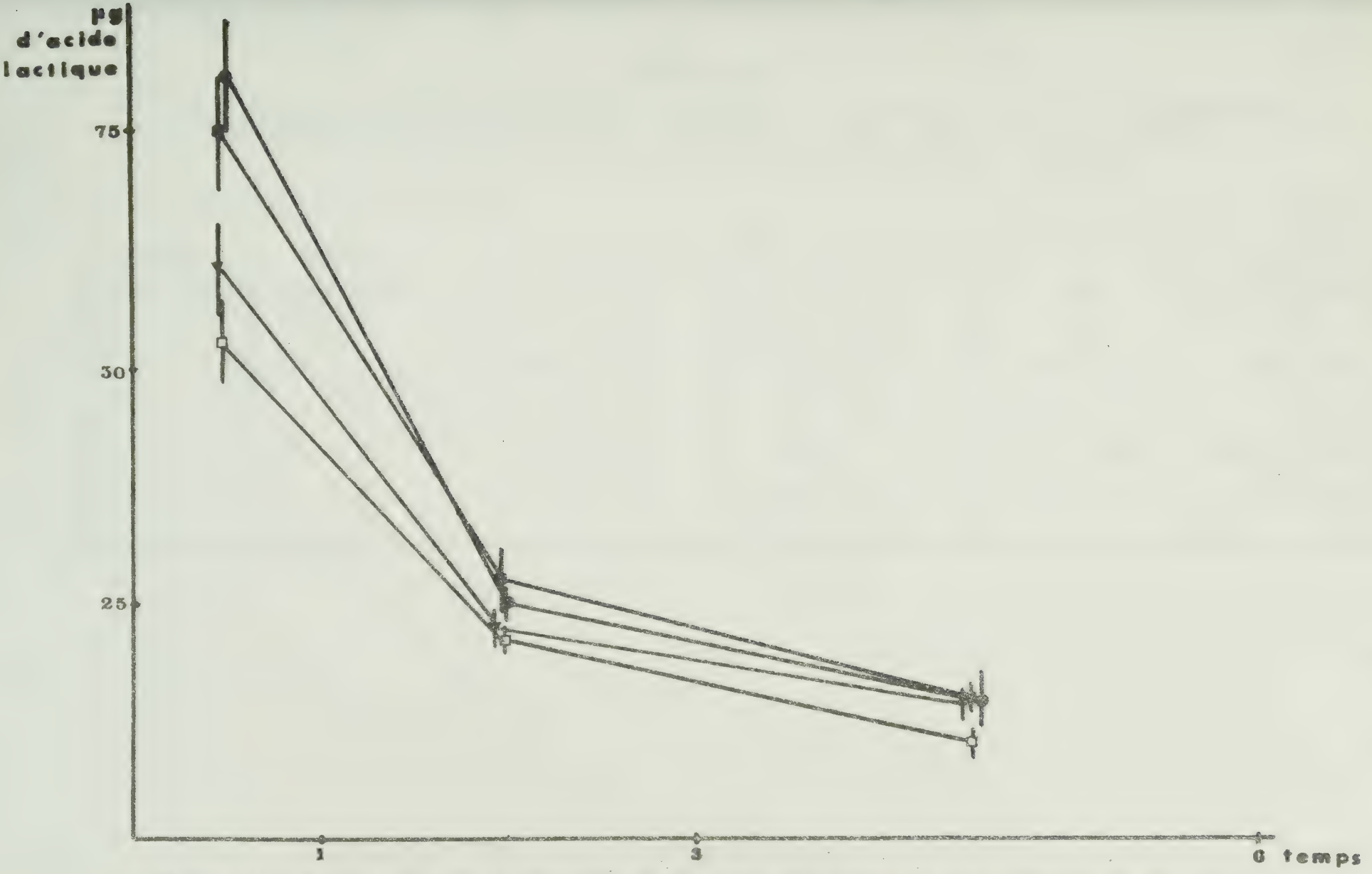


Figure 11 - Production d'acide lactique en µg/100mg/heure dans le bain d'incubation par le diaphragme isolé de rat hypophysectomisé témoin □—□ , sous l'influence de la STH (20µg/ml) ●—● , de la théophylline (0,5mg/ml) ▼—▼ , et de la STH + théophylline ■—■ .

TABLEAU XXI

Sortie de radioactivité ^{14}C liée au ^{14}C D glucose (U) du diaphragme isolé de rat hypophysectomisé sous l'influence de la STH (10µg/ml), de la théophylline (0,5mg/ml) après des incubations de 1, 3 et 6h et ^{14}C incorporé dans le glycogène à la 6ème heure (6 essais par expérience)

Témoin		Traité		Relache de radioactivité en pourcentage D/T			14C dans glycogène en pourcent. D/T
Théo	STH	Théo	STH	1h	3h	6h	
-	-	-	+	102,3 ± 2,3	92,5 ± 5,3	102,9 ± 6,5	94,4 ± 21,1
-	-	+	-	100,5 ± 4,1	95,7 ± 6,4	140,6 ± 15,1	136,1 ± 27,7
-	+	+	+	92,6 ± 3,5	120,4 ± 7,4	177,1 ± 22,8*	188,6 ± 34,4*
+	-	+	+	95,4 ± 6,8	113,9 ± 9,2	118,3 ± 8,1	116,9 ± 27,7

* $P < 0,05$

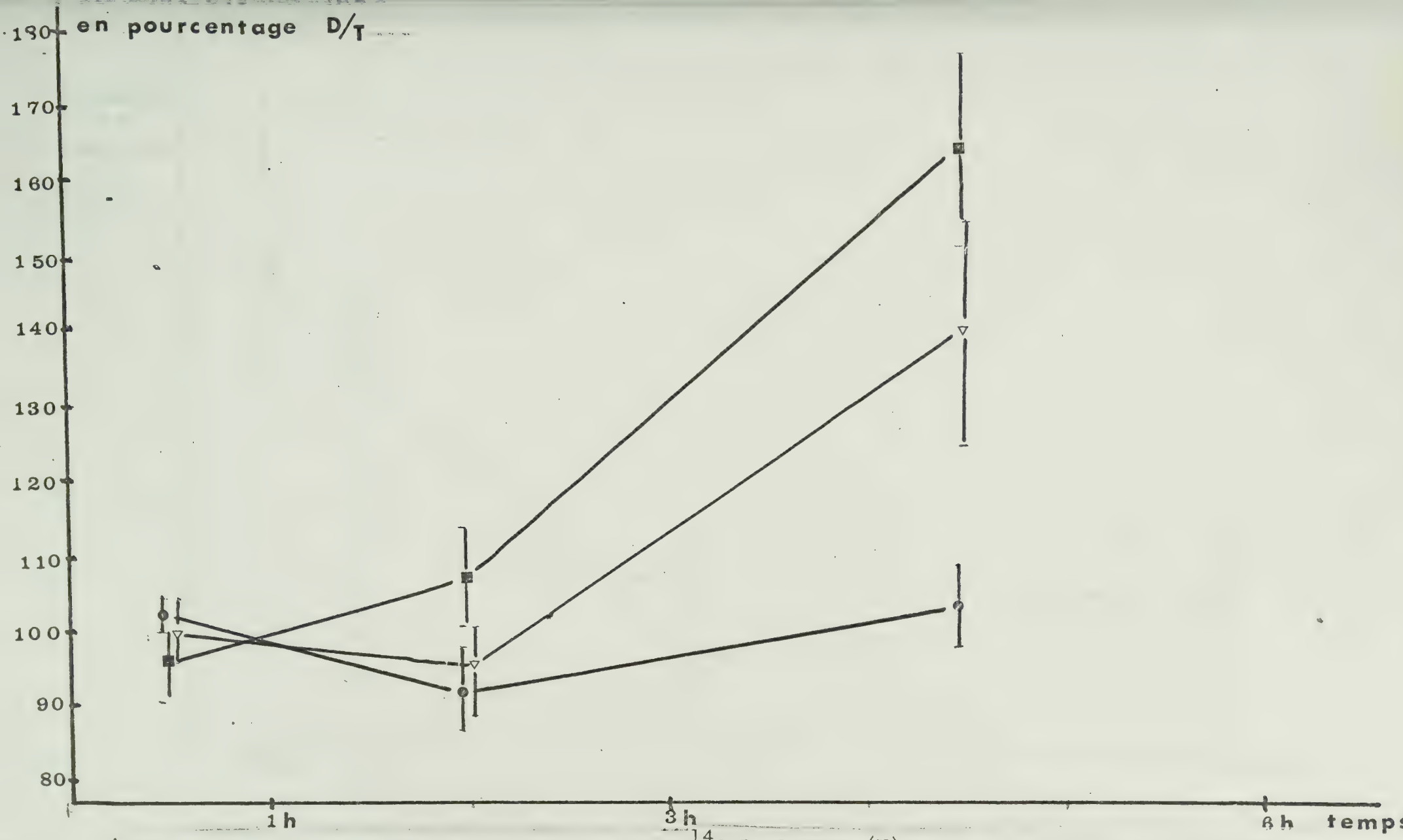


Figure 12 - Sortie de la radioactivité liéeau ^{14}C D glucose (U) en 1h, 3h et 6h par le diaphragme isolé de rat hypophysectomisé, sous l'influence de la STH (20µg/ml) ●—● , de la théophylline (0,5mg/ml) ▽—▽ et de la STH + théophylline ■—■ en pourcentage par rapport à un témoin non traité.

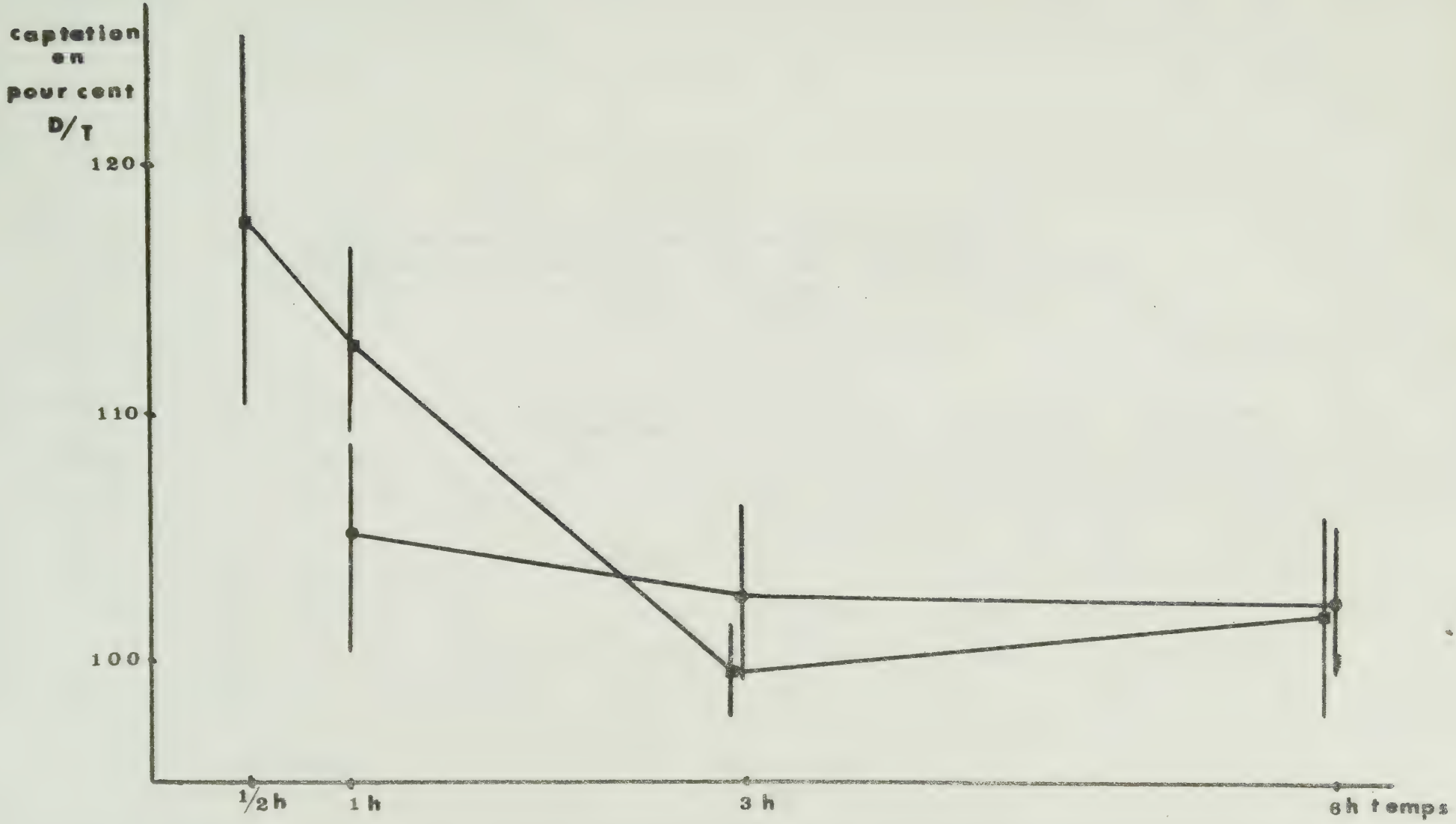


Figure 13 - Evolution dans le temps de la captation du ^{14}C D xylose (U) ●—● ou du ^{14}C D glucose (U) ■—■ par le diaphragme isolé de rat hypophysectomisé sous l'influence de la STH

(Résultats extraits des tableaux IV, V, VI, XIV et XV)

TABLEAU XXII

Action de la STH (5µg/ml) et du méthyl 2 imidazole (10mg/ml)
sur la captation du ^{14}C D xylose (U) ou du ^{14}C D glucose (U)
et mesure de la formation de l'AMPc (dosé selon la technique de BROOKER)
sur le diaphragme isolé de rat hypophysectomisé après des incubations de 3 ou 6h
(6 essais par expérience)

Composition du milieu d'incubation				3 HEURES			6 HEURES		
Témoin		Dosage		Captation du D xylose en pourcent. D/T	Captation du D glucose en pourcent. D/T	AMPc formé en pourcent. D/T	Captation du D xylose en pourcent. D/T	Captation du D glucose en pourcent. D/T	AMPc formé en pourcent. D/T
STH	M2I	STH	M2I						
-	-	-	+	114,9 ± 6,2 *	107,4 ± 3,3	64,2	104,5 ± 1,6	125,9 ± 6,4 **	82,7
-	+	+	+	-	99,4 ± 4,9	144,2	100,1 ± 3,1	99,6 ± 1,2	148,3
+	-	+	+	119,9 ± 4,3 **	109,9 ± 7,7	103,0	102,2 ± 2,1	129,1 ± 4,2 **	135,0

* $P < 0,05$ ** $P < 0,01$

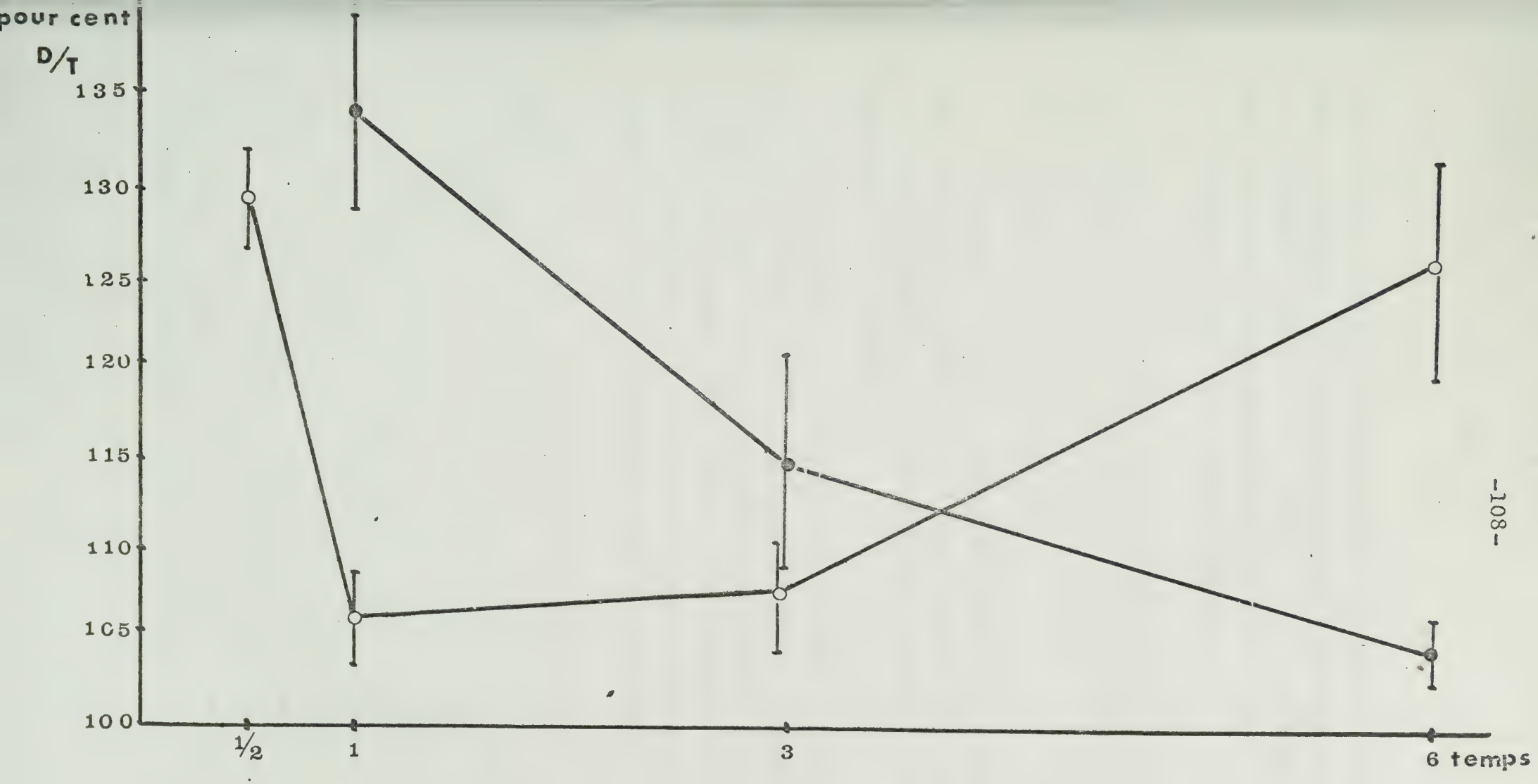


Figure 14 - Evolution de la captation du ^{14}C D xylose (U) ●—● ou du ^{14}C D glucose (U) ○—○ par le diaphragme isolé de rat hypophysectomisé sous l'influence du méthyl 2 imidazole (10mg/ml).

est nettement diminué, mais la radioactivité tritiée retenue aussi, le rapport "R" n'est pas affecté. D'après ces résultats l'annulation de l'effet de la STH sur la captation des sucres n'est pas liée à une augmentation du taux de l'AMPc, ce taux et la captation étant simultanément réduits.

Mais comment expliquer que la STH en milieu théophylline ou la théophylline en milieu STH (5µg/ml) réduisent la captation des sucres ? (Pour une dose de STH de 20µg/ml on ne retrouve aucune action de la théophylline).

Les mesures de sortie du carbone radioactif peuvent conduire à des conclusions variables si l'on n'examine que cette sortie, ou si on la compare au ^{14}C incorporé au glycogène à la fin de la 6ème heure d'incubation.

En 3 et 6 heures, la STH n'a pas d'effet; la théophylline seule ou en présence de STH provoque un flux sortant important de C^{14} à la 6ème heure. La théophylline accélérant cette sortie, la captation apparente est diminuée. Ce phénomène est en relation avec la diminution de la captation observée sous l'influence de l'association STH + théophylline en 3 ou 6 heures.

En comparant le flux sortant en 6 heures et le ^{14}C "incorporé" dans le glycogène, nous voyons sur le tableau XXI et la figure 12 que ces paramètres sont tout à fait parallèles et nous pensons que la sortie du ^{14}C n'est qu'un reflet des réserves en glycogène de la cellule. La théophylline en une heure diminue l'incorporation du ^{14}C dans le glycogène (Tableau X), en 6 heures on observe l'inverse. Il existe une différence dans la technique : pour les essais de captation, le glucose est incorporé lors de l'action des corps testés, pour les essais de flux, le sucre porteur des ^{14}C est capté avant toute action, nous pensons qu'au point de départ de ces actions, l'incorporation du ^{14}C est la même chez les fragments "Témoin" et "dosage". Pendant la 1ère heure, la

théophylline entraîne une faible "économie" de glycogène en valeur relative dans le "dosage" par rapport au témoin non traité. A la 6ème heure, les valeurs absolues de flux sortant du ^{14}C sont très diminuées par rapport à celles de la 1ère heure. Pour l'action de l'association théophylline + STH comparée à celle de la STH seule, la sortie est de 37.800 cpm/100mg/heure pour la STH et de 35.000 pour l'association, la différence de 2.800 cpm représente une baisse de sortie de ^{14}C de 7,4 p.cent dûe à la théophylline. A la 6ème heure, les sorties horaires sont respectivement de 430 et 790 cpm/100mg, l'écart de 360cpm représente 77 p.cent d'augmentation de ^{14}C venant du ^{14}C D glucose (U) sous l'influence de la théophylline en milieu STH.

Nous pensons donc que la sortie du ^{14}C n'est que la conséquence de phénomènes se passant durant la première heure et que les diminutions apparentes de la captation des sucres sous l'influence de la théophylline et de la STH ne sont que le résultat d'une sortie accrue du sucre et de ses métabolites, ces mouvements ne semblent pas en relation avec une variation de l'AMPc.

La STH seule augmente la production de l'acide lactique dans le bain d'incubation mais en présence de théophylline l'hormone n'a pas d'action. La figure 11montre que la production horaire de l'acide lactique baisse dans le temps. Cette production doit varier parallèlement aux réserves de glucides donc en partie au ^{14}C incorporé dans le glycogène, cette relation est vérifiée pour la théophylline seule ou la STH en présence de théophylline, mais pour la théophylline en présence de STH la production d'acide lactique est fortement diminuée par rapport au ^{14}C incorporé. HENION et coll. (1967) ont montré que l'AMPc et son dérivé monobutyrylé provoquent chez le chien une hyperlactidicémie suivie d'une hypolactidicémie. Nous observons peut-être ici un phénomène de ce type. Après l' action de l'AMPc en une heure, malgré une augmentation du substrat, la quantité absolue d'acide formé est inchangée, soit une baisse du rapport acide produit/substrat.

de la théophylline et de la 3MX ne sont que le résultats d'une
mortie accrue de sucre et de ses métabolites, ces mouvements ne
semblent pas en relation avec une variation de l'AMPc.

La 3MX seule augmente la production de l'acide lactique dans
de l'acide lactique baisse dans le temps. Cette production doit
varier parallèlement aux réserves de glycogène dans un partie en
^{14}C incorporé dans le glycogène, cette relation est vérifiée pour
la théophylline seule ou la 3MX en présence de théophylline, mais
pour la théophylline en présence de 3MX la production d'acide
lactique est fortement diminuée par rapport au ^{14}C incorporé.
(Smith et coll. (1967) ont montré que l'AMPc et son dérivé mono-
butyryle provoquent chez le chien une hyperlactacidémie suivie
d'une hypolactacidémie. Une diminution possible
de ce type. Après l'action de l'AMPc ou une baisse, malgré une
augmentation du substrat, la quantité absolue d'acide lactique

Le M 2 I agit différemment sur la captation du sucre suivant le temps d'incubation. La figure 14 illustreles différences pouvant exister entre le glucose et le xylose. Pour le glucose, la captation est forte la première demi-heure et chûte brusquement en une heure pour remonter à la 6ème heure. Pour le xylose, la captation est forte au début mais décroît dans le temps. L'évolution de la captation du D xylose peut être considérée comme logique. Le M 2 I en pénétrant dans la cellule réduit la différence d'osmolarité entre les milieux intra et extracellulaire. Cette différence s'amenuise dans le temps ce qui entraîne une annulation progressive de l'action du dérivé imidazolé. Pour le glucose, le phénomène est plus compliqué et est peut-être le résultat de deux actions différées dans le temps. D'abord la diminution de la différence d'osmolarité explique la baisse de captation observée entre une demi-heure et 1 heure d'incubation. L'AMPc est abaissé par le M 2 I, une néoglycogénèse tendant à faire entrer le glucose peut-être responsable de l'augmentation de la captation en temps long. Entre 1 et 3 heures, un équilibre s'établirait entre ces deux actions, l'une s'annulant, l'autre commençant.

En 3 ou 6 heures, la STH en milieu M 2 I n'a plus d'action sur la captation des sucres.

CONCLUSION

La STH, sur le diaphragme isolé de rat hypophysectomisé après 3 ou 6 heures d'incubation, ne provoque pas d'augmentation de la formation d'AMPc, de captation accrue des sucres ou de formation d'acide lactique. La théophylline inverse les actions que la STH possède en une demi-heure ou 1 heure. Le M 2 I ne modifie pas l'action de la STH au cours d'incubation de longue durée.

Comme nous l'avons fait lors de l'étude de la phase A, nous allons examiner si les actions de l'AMPc ou du dibutyryl AMPc sur la captation des sucres suivent celles de la STH et s'annulent dans le temps.

C H A P I T R E I X

ACTION DE L'AMPc ET DU DIBUTYRYL AMPc SUR LA CAPTATION DES SUCRES PAR LE DIAPHRAGME ISOLE DE RAT HYPOPHYSECTOMISE APRES 3 OU 6 HEURES D'INCUBATION

Au chapitre V nous observons que l'AMPc et le dibutyryl AMPc agissent comme la STH en présence de théophylline sur la captation globale du D xylose ou du D glucose par le diaphragme isolé de rat hypophysectomisé en temps court, puis au chapitre VIII nous remarquons que la STH perd son action sur la captation des sucres sans pouvoir rattacher cette inactivité à une influence de l'AMPc. Nous avons testé les deux nucléotides sur la captation des sucres après des incubations de 3 et 6 heures et comparé leurs actions à celle de la STH.

TECHNIQUE

La technique habituelle pour la mesure de la captation des sucres est employée. Les doses des produits testés sont celles déjà utilisées au chapitre précédent, soit: STH 20µg/ml, AMPc 100 µg /ml, dibutyryl AMPc 100µg/ml et théophylline 0,5mg/ml.

RESULTATS

Sur le tableau XXIII sont transcrits les résultats des captations provoquées par les trois corps comparés au témoin ou les uns par rapport aux autres en présence de théophylline (une partie de ce tableau, pour l'action en une heure, est reprise du tableau XI).

Les figures 15 et 16 montrent l'évolution des pourcentages de captation du glucose ou du xylose entre ces trois corps et le témoin selon la durée de l'incubation.

Les valeurs absolues de captation du D glucose en 1 heure augmentent avec la longueur de la préincubation comme le montre la figure 17.

Le fait primordial est le parallélisme des captations provoquées par les trois corps pris séparément par rapport au témoin. Alors qu'en une heure ces trois corps sont actifs, en 3 ou 6 heures ils ne provoquent que peu de différence de captation par rapport au témoin, seul l'AMPc en 6 heures, pour le glucose, a une action. La STH en 6 heures pour ce même sucre a son action plus atténuée que celle des nucléotides comme en attestent les différences significatives de captation entre la STH et le dibutyryl AMPc ou entre la STH et l'AMPc.

DISCUSSION

L'accroissement de la captation en valeur absolue, suivant la durée de la préincubation a déjà été signalée pour le xylose par HJALMARSON (1968a). L'épuisement progressif des réserves métaboliques du tissu pendant la préincubation peut expliquer l'augmentation ultérieure de captation du glucose marqué que nous observons.

TABLEAU XXIII

Influence du dibutyryl AMPc (100µg/ml), de l'AMPc (100µg/ml) et de la STH (20µg/mg) en présence de théophylline (0,5mg/ml) sur la captation du ^{14}C D glucose, du ^{14}C D xylose par le diaphragme isolé de rat hypophysectomisés après des incubations de 1h, 3h ou 6h (6 essais par expérience)

Composition du milieu d'incubation						Captation des sucres en pourcentage Dosage/Témoin					
Témoin			Dosage			1h		3h		6h	
AMPc	Dibut	STH	AMPc	Dibut	STH	Xylose	Glucose	Xylose	Glucose	Xylose	Glucose
-	-	-	-	+	-	112,6 ± 2,2**	112,6 ± 5,1**	102,8 ± 6,8	97,9 ± 2,5	99,0 ± 3,6	102,4 ± 1,8
-	-	-	+	-	-	114,1 ± 5,1*	106,7 ± 2,4	96,3 ± 2,6	99,0 ± 2,2	102,7 ± 4,3	106,4 ± 1,8
-	-	-	-	-	+	114,9 ± 5,9	116,2 ± 6,6**	106,1 ± 1,5	100,4 ± 1,7	101,9 ± 3,0	96,9 ± 2,1
-	+	-	+	-	-	101,4 ± 4,1	96,1 ± 6,5	95,4 ± 5,6	102,3 ± 4,8	103,8 ± 3,0	103,2 ± 2,3
-	+	-	-	-	+	101,0 ± 5,1	103,5 ± 5,2	105,6 ± 7,5	103,4 ± 2,8	103,5 ± 4,6	94,0 ± 2,3*
+	-	-	-	-	+	100,7 ± 2,7	109,1 ± 5,8	110,6 ± 3,7	101,6 ± 3,1	101,7 ± 4,2	91,0 ± 1,4**

* P < 0,05 ** P < 0,01

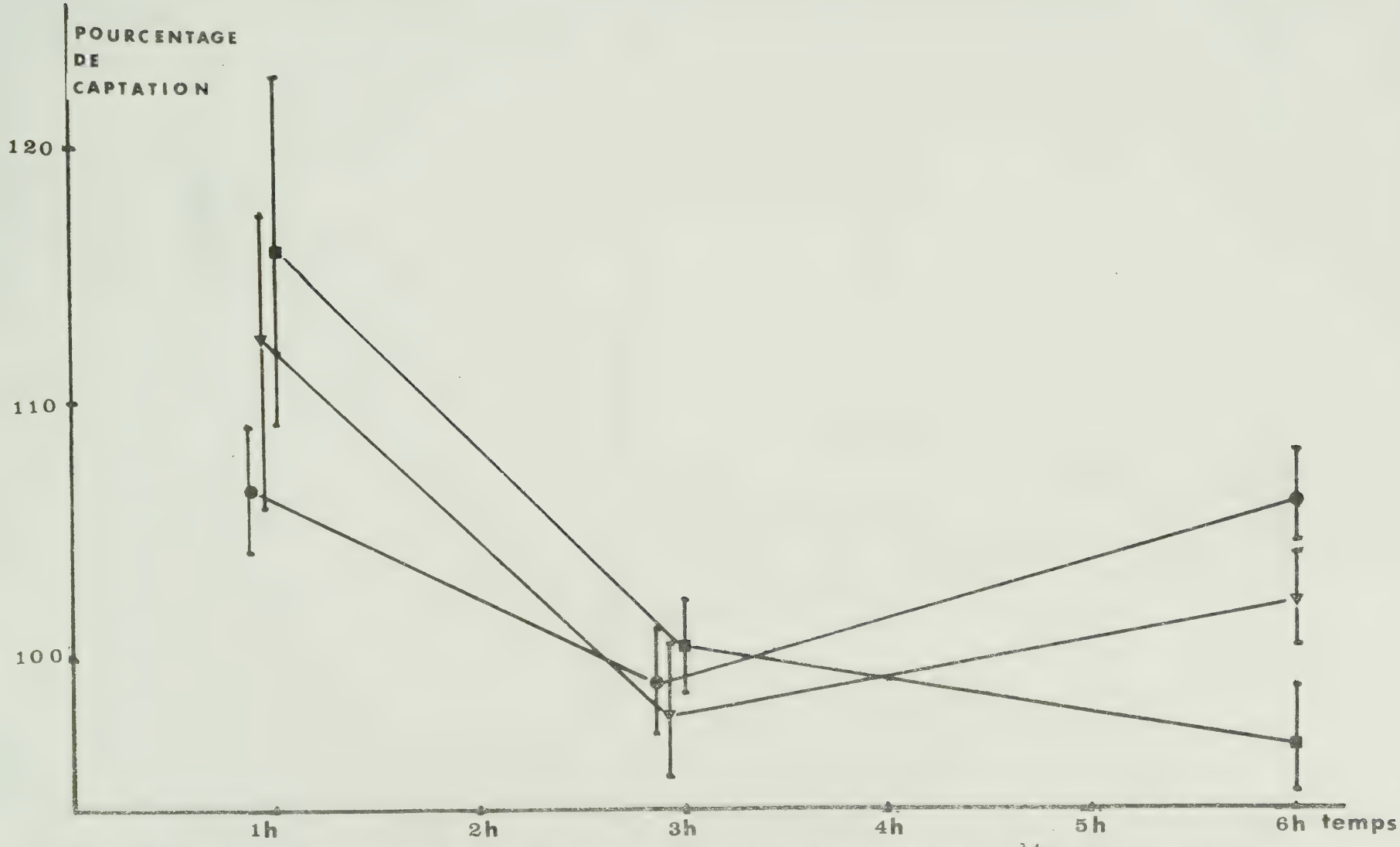


Figure 15 - Valeur en pourcentage par rapport au témoin de la captation du ^{14}C D glucose (U) par le diaphragme isolé de rat hypophysectomisé, provoquée par la STH (20µg/ml) ■—■ , par l'AMPc (0,1mg/ml) ●—● et par le dibutyryl AMPc (0,1mg/ml) ▽—▽ en présence de théophylline (0,5mg/ml) après une, trois et six heures d'incubation.

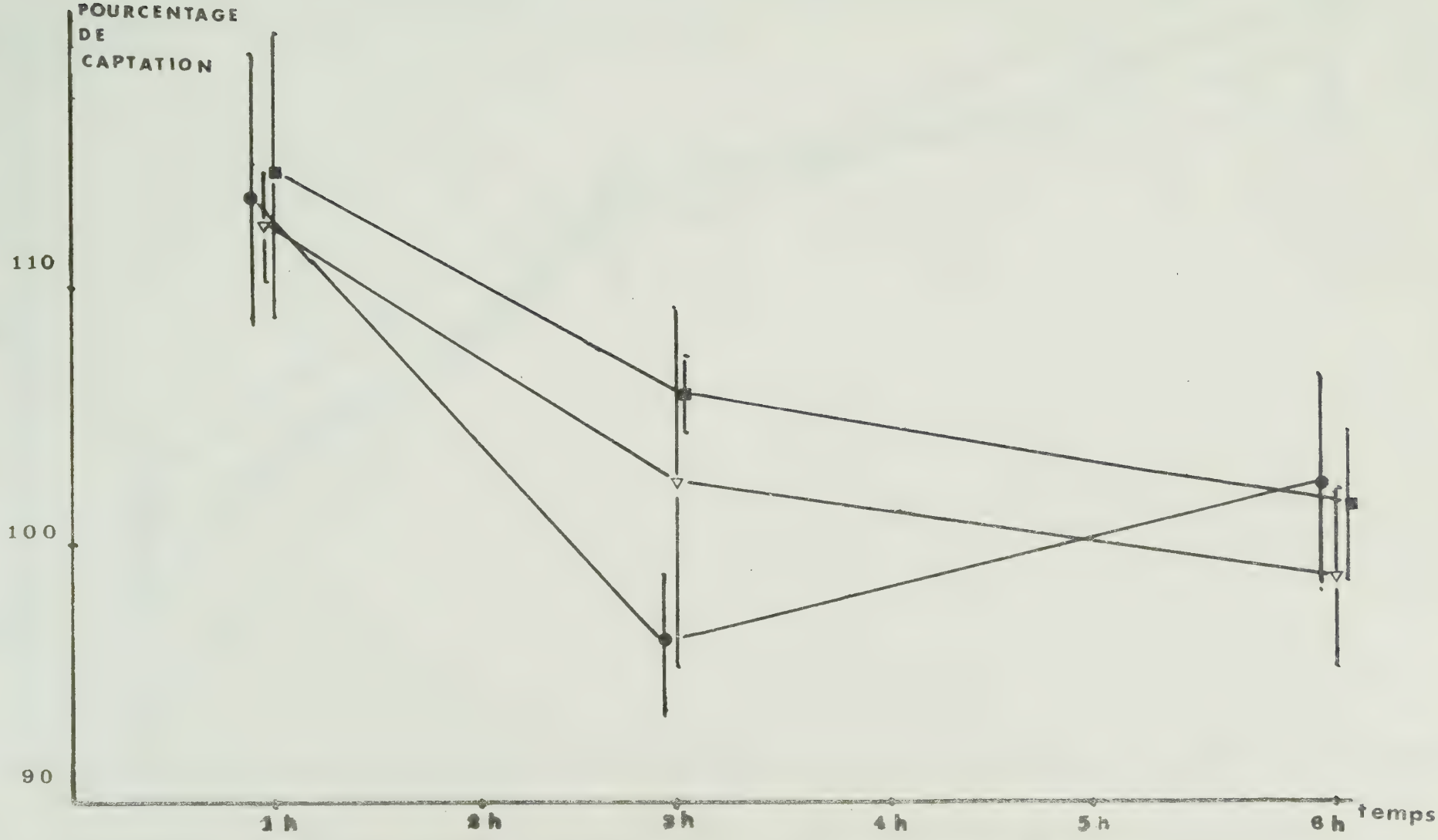


Figure 16 - Valeur en pourcentage par rapport au témoin de la captation du ^{14}C D xylose (U), par le diaphragme isolé de rat hypophysectomisé, provoquée par la STH (20µg/ml) ■—■, par l'AMPc (0,1mg/ml) ●—● et par le dibutyryl AMPc (0,1mg/ml) ▽—▽ en présence de théophylline (0,5mg/ml) après une, trois et 6 heures d'incubation.

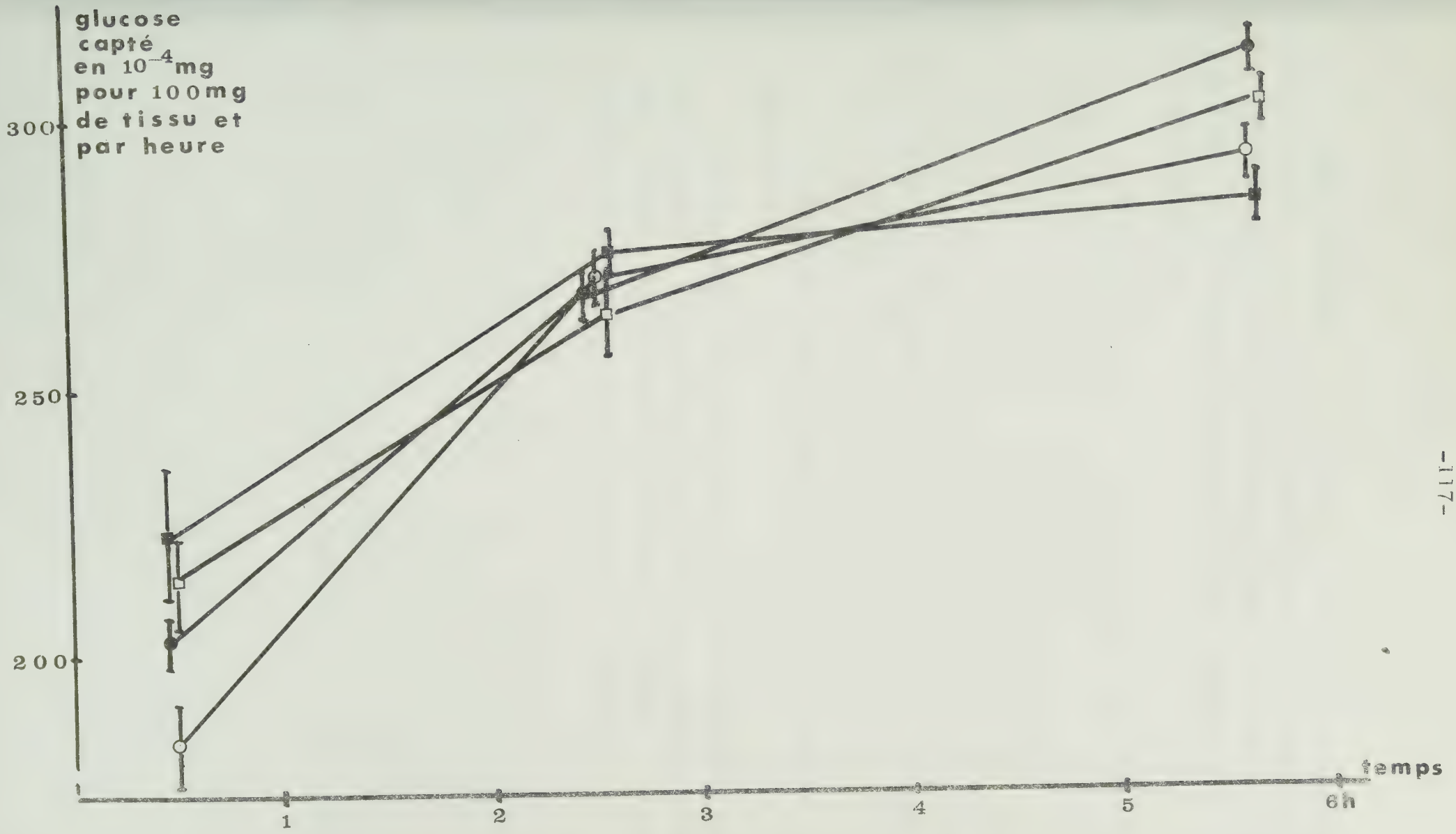


Figure 17 - Evolution suivant la longueur de la préincubation de la captation horaire du ^{14}C D glucose (U) en présence de théophylline (0,5mg/ml) par des diaphragmes isolés de rats hypophysectomisés témoins (○-○) traités par la STH (20µg/ml) ■-■ , par de l'AMPc (100µg/ml) ●-● ou du dibutyryl AMPc (100µg/ml) □-□ (6 essais par expérience).

L'annulation de l'action dans le temps des deux nucléotides testés suit celle de la STH; une modification chimique de ces corps doit être exclue, le bain d'incubation étant entièrement renouvelé au début de la phase de captation du sucre (après 2 ou 5 heures de préincubation).

La STH n'ayant plus d'action ni sur les captations, ni sur l'AMPc, nous pouvions penser que la disparition du deuxième effet entraînait le premier. Nous constatons ici que l'AMPc lui-même (et son dérivé dibutyrylé) perd son activité alors que sa concentration extracellulaire est maintenue par renouvellement du bain et par la présence de la théophylline qui réduit sa dégradation. Donc, même si la STH avait continué à élever le taux d'AMPc comme en temps court, son action sur la captation aurait disparu .

L'inactivation dans le temps des nucléotides peut avoir deux explications :

Pour SCHIMMEL et GOODMAN (1971), le dibutyryl AMPc a des actions variables sur le tissu adipeux de rat suivant sa concentration. A faible concentration (inférieure à 0,30mM), il active l'entrée du glucose, à plus forte dose, il l'inactive.

La pénétration cellulaire du dibutyryl AMPc et plus particulièrement de l'AMPc est mauvaise, mais dans nos expériences, les nucléotides étant maintenus en contact avec le diaphragme 3 ou 6 heures, ils peuvent entrer en quantité suffisante dans la cellule, d'autant plus que leur destruction est inhibée par la théophylline et avoir ainsi une action inhibitrice à "forte concentration intracellulaire" du seul fait de la prolongation de l'incubation.

CONCLUSION

L'AMPc et le dibutyryl AMPc, après des contacts de 3 ou 6 heures, ne provoquent plus d'augmentation de captation du D xylose ou du D glucose par le diaphragme isolé de rat hypophysectomisé. La perte d'activité peut être le résultat d'une augmentation du taux intracellulaire des nucléotides du fait de la prolongation du contact avec le tissu.

Une autre action peut être à l'origine de l'inactivité en 3 ou 6 heures de la STH et des nucléotides. Pour la STH les inhibiteurs de la synthèse protéique prolongent dans le temps la phase initiale d'hypercaptation, nous allons étudier dans le chapitre suivant l'action de ces inhibiteurs sur la captation des sucres provoquée par la STH et les nucléotides.

C H A P I T R E X

ACTION DES INHIBITEURS DE LA SYNTHESE PROTEIQUE SUR LA CAPTATION DES SUCRES PROVOQUEE PAR LA STH, l'AMPc ET LE DIBUTYRYL AMPc

La STH et les deux nucléotides, après des incubations de 3 ou 6 heures, perdent leurs actions sur la captation des sucres par le diaphragme isolé de rat hypophysectomisé, l'hormone elle-même ne provoque pas de variation du taux intracellulaire de l'AMPc.

Les inhibiteurs de la synthèse protéique comme la puromycine l'actinomycine D, la cycloheximide sont capables de garder à la STH le pouvoir hypercaptant qu'elle présente initialement (HJAL-MARSON, 1968a-b, 1969 - GOODMAN, 1965a, 1967b, 1968d) sur le muscle ou le tissu adipeux. Pour DAWSON et BECK (1968), la STH a les mêmes effets dans le temps, sur la captation des acides aminés par le diaphragme que sur celle des sucres. L'actinomycine D déprime la synthèse protéique et, malgré cette action propre, conserve à la STH le pouvoir de capter plus les acides aminés.

La diminution de captation des sucres suivant la diminution de l'AMPc, un rapport entre les inhibiteurs de synthèse protéique et l'AMPc peut être étudié.

Des auteurs ont déjà travaillé sur les effets que peuvent avoir ces corps sur la formation de l'AMPc : GRUHNER et SEGAL (1970) observent que la cycloheximide (et non l'actinomycine D) comme l'AMPc, chez le rat surrénalectomisé diminue l'activité de la

glycogène synthétase. APPLEMAN et KEMP (1966) remarquent qu'un autre inhibiteur de la synthèse protéique, la puromycine, inhibe la phosphodiestérase du diaphragme. L'ACTH provoque une production accrue de corticostérone par les surrénales, la cycloheximide pouvant inhiber cette production (GARREN et coll.,1965) mais sans modifier la formation de l'AMPc (GRAHAME-SMITH et coll. (1967), pour WARREN et GARREN (1968) la cycloheximide inhibe la transformation du cholestérol en pregnenolone.

PETERKOFSKY et GAZDAR (1971) étudient directement la production d'AMPc dans le milieu de culture d'Escherichia coli. Le chloramphenicol, la rifamycine et l'hydroxyurée, utilisés en tant qu'inhibiteurs de la synthèse protéique, dépriment la croissance du bacille ainsi que l'utilisation du D glucose et la production d'AMPc.

Deux auteurs, FAIN (1968) et GOODMAN (1968b) ont étudié l'action de la STH sur la lipolyse dans les cellules adipeuses de rats. Leurs résultats sont tout à fait comparables : la STH augmente la sensibilité des cellules à l'action lipolytique de la théophylline ou de la noradrénaline; cette sensibilisation n'a lieu qu'après 1 à 2 heures de latence. Pour FAIN, avec des cellules de rats normaux, l'actinomycine D et la cycloheximide bloquent l'effet de la STH; GOODMAN,au contraire, voit une potentialisation, et ce, avec des cellules venant d'animaux entiers ou hypophysectomisés. Pour le premier auteur, l'activation de la lipolyse par l'hormone est le résultat de la synthèse d'une protéine qui facilite l'action de l'adénylcyclase. Pour GOODMAN la cycloheximide,comme la STH,bloque la synthèse d'une protéine inhibitrice de la lipolyse, cette protéine pouvant être la phosphodiestérase.

Nous avons étudié les effets de deux inhibiteurs de la synthèse protéique sur l'action de la STH, en présence ou en absence de théophylline, sur la captation du D glucose ou du D

xylose et la formation de l'AMPc (appréciée par la méthode avec marquage préalable à l'adénine ^{3}H-2), puis les actions de ces mêmes inhibiteurs de synthèse protéique sur l'action des deux nucléotides.

Technique

Les produits sont utilisés aux doses suivantes :

STH : 20µg/ml AMPc : 100µg/ml dibutyryl AMPc : 100µg/ml

puromycine : 50µg/ml cycloheximide : 200µg/ml théophylline : 0,5mg/ml

Les incubations durent 3 ou 6 heures, la durée de captation du sucre marqué est de 1 heure. Les inhibiteurs de synthèse protéique sont mis dans le dernier bain de lavage après l'incorporation de l'adénine, ainsi les diaphragmes sont en contact avec les inhibiteurs avant de l'être avec l'hormone ou les nucléotides.

Résultats

Sur le tableau XXIV sont reportés les résultats des actions en 3 heures de la STH, des inhibiteurs de synthèse protéique et de la théophylline sur la captation des deux sucres et la formation de l'AMPc.

La puromycine diminue la captation du D xylose de manière significative et ne change pas la captation dûe à l'association STH-théophylline.

Avec le D xylose, la cycloheximide seule n'a pas d'action mais provoque une légère augmentation de la captation du sucre par l'association STH-théophylline.

Pour le D glucose, les deux inhibiteurs n'ont par eux-mêmes que des actions négligeables et abaissent légèrement le taux de l'AMPc. Les associations STH-cycloheximide comparées soit à l'inhibiteur, soit à la STH provoquent une augmentation significative de la captation du sucre. La puromycine n'a pas d'action dans les mêmes conditions.

Les résultats obtenus après une incubation d'une durée totale de 6 heures sont reportés sur le tableau XXV. Les inhibiteurs n'ont pas d'action sur la captation du D glucose. La puromycine est encore peu active sur l'AMPc, tandis que la cycloheximide le fait baisser. Un résultat paradoxal apparaît : la cycloheximide en milieu STH fait diminuer la captation, soit l'effet inverse de celui observé en 3 heures.

Le tableau XXVI indique les résultats des actions de la STH, de l'AMPc et du dibutyryl AMPc en 3 heures ou 6 heures en présence de puromycine ou de cycloheximide. Ce tableau ne montre, en fait, qu'une absence totale d'action des trois corps testés, les inhibiteurs n'étant pas capables de restaurer l'activité initiale des nucléotides et de la STH. On observe même le phénomène inverse, l'AMPc et le dibutyryl AMPc abaissent en 3 heures et en présence de puromycine, la captation du D glucose.

Discussion

Le seul résultat positif observé est l'accroissement de la captation du D glucose par la cycloheximide en présence de STH en 3 heures. Il convient donc d'analyser l'échec partiel de ces essais et de savoir pourquoi nous n'avons pu reproduire que partiellement les essais de HJALMARSON.

Des différences entre les essais de cet auteur et les nôtres portent sur l'âge des animaux, le sexe, les durées d'incubation,

TABLEAU XXIV

Action de la STH (20µg/ml), de la théophylline (0,5mg/ml), de la puromycine (50µg/ml) et de la cycloheximide (200µg/ml) sur la captation du ^{14}C D xylose (U), du ^{14}C D glucose (U) et la formation de l'AMPc (dose selon la technique de KUO) par le diaphragme isolé de rat hypophysectomisé **après une incubation de 3 heures**

Composition du milieu d'incubation						Inhibiteur testé							
						Cycloheximide				Puromycine			
Témoin			Dosage			Captation du D xylose en pourcent. D/T	Captation du D glucose en pourcent. D/T	AMPc formé en pourcent. D/T	"R"	Captation du D xylose en pourcent. D/T	Captation du D glucose en pourcent. D/T	AMPc formé en pourcent. D/T	"R"
STH	Théo	Inhib.	STH	Théo	Inhib.								
-	-	-	-	-	+	98,5 ± 4,2 (6)	98,6 ± 4,6 (6)	71,0	91,0	88,3 ± 3,0**	103,6 ± 3,6 (6)	92,6	89,6
+	-	-	+	-	+		115,2 ± 4,7* (6)	74,9	69,9		107,1 ± 7,9 (6)	95,1	107,6
-	-	+	+	-	+		107,5 ± 2,4** (12)	78,0	85,3		102,5 ± 4,7 (6)	135,6	116,9
-	-	+	-	+	+		104,9 ± 1,6 (6)	121,0	94,5				
-	+	-	-	+	+		108,1 ± 3,6 (12)	-	-		101,6 ± 4,9 (6)		
-	+	+	+	+	+		99,5 ± 2,4 (6)	102,1	109,9				
+	-	+	+	+	+		97,8 ± 2,4 (6)	107,7	103,3				
+	+	-	+	+	+	110,6 ± 6,9 (6)				98,0 ± 7,0 (6)			

( ) Nombre d'essais * P < 0,05 ** P < 0,01

TABLEAU XXV

Action de la STH (20µg/ml), de la théophylline (0,5mg/ml), de la puromycine (50µg/ml), de la cycloheximide (200µg/ml) sur la captation du ^{14}C D glucose et la formation de l'AMPc (dose selon la technique de KUO) par les diaphragmes isolés de rats hypophysectomisés après une incubation de 6 heures

Composition du milieu d'incubation						Inhibiteur testé : Cycloheximide			Inhibiteur testé : Puromycine		
Témoin			Dosage			Captation du glucose	AMPc formé	"R"	Captation du glucose	AMPc formé	"R"
STH	Théo	Inh.	STH	Théo	Inh.						
-	-	-	-	-	+	96,8 ± 2,5 (6)	55,7 (5)	54,1	105,2 ± 4,2 (6)	93,1	11,4
+	-	-	+	-	+	89,2 ± 4,1* (6)	100,3	123,6	99,6 ± 5,6 (6)	78,8*	79,3*
-	-	+	+	-	+	101,6 ± 3,4 (12)	82,3	110,9	103,2 ± 3,2 (12)	115,7	132,9
-	-	+	-	+	+	107,7 ± 6,8 (6)	49,2	65,2	97,6 ± 8,0 (6)	146,7	120
-	+	-	-	+	+	100,6 ± 2,8			99,0 ± 4,5 (6)		
-	+	+	+	+	+	98,6 ± 7,5 (6)	68,7	89,5	1o3,1 ± 7,3 (6)	86,0	140,4
+	-	+	+	+	+	98,6 ± 7,6 (6)	67,2	64,5	95,3 ± 2,2 (6)	104,1	118,0

* $P < 0,05$ ( ) Nombre d'essais

TABLEAU XXVI

Action de la puromycine (50µg/ml) ou de la cycloheximide (200µg/ml) en présence de théophylline (0,5mg/ml) sur la captation du ^{14}C glucose (U) provoquée par la STH (20µg/ml), l'AMPc (0,1mg/ml) ou le dibutyryl (0,1mg/ml) après une incubation de 3 heures ou 6 heures par les diaphragmes isolés de rats hypophysectomisés

Composition du milieu d'incubation						Temps d'incubation : 3h			6h		
Témoin			Dosage			Corps testés : STH	AMPc	Dibut	STH	AMPc	Dibut
Corps testés	Cyclo	Puro	Corps testés	Cyclo	Puro						
-	-	-	-	+	-		108,1 ± 3,6* (12)			100,6 ± 2,8	
-	-	-	+	-	-	93,2 ± 2,8 (12)	100,0 ± 2,3 (18)	100,4 ± 3,1 (18)	97,3 ± 1,7	102,3 ± 1,5 (18)	102,6 ± 1,1 (12)
+	-	-	+	+	-	97,8 ± 4,5 (6)	104,2 ± 4,9 (6)	106,5 ± 4,5 (6)	98,6 ± 3,2 (6)	99,9 ± 5,7 (6)	94,4 ± 4,8 (6)
-	+	-	+	+	-	99,5 ± 2,4 (6)	95,5 ± 3,5 (6)	102,0 ± 5,3 (6)	98,6 ± 7,6 (6)	100,0 ± 6,4 (6)	92,2 ± 4,8 (6)
-	-	-	-	-	+		101,6 ± 4,9 (6)			99,0 ± 4,5 (6)	
+	-	-	+	-	+		110,1 ± 4,9 (6)	94,0 ± 4,0 (6)	99,6 (6)	105,3 ± 2,4 (6)	
-	-	+	+	-	+		86,9 ± 2,3**	87,9 ± 3,3*	103,1 ± 7,3	106,8 ± 3,6	

( ) Nombre d'essais * $P < 0,05$ ** $P < 0,01$

les activités mesurées. Mais nous pensons que ces différences ne sont pas à l'origine des résultats divergents qui ont été observés.

La seule modification notable porte sur la composition du bain d'incubation et nous présumons que de là vient peut-être l'inactivité des inhibiteurs de synthèse protéique. Cet auteur a étudié la captation du D xylose après des préincubations dans des bains de D glucose à assez forte concentration (2,5mg/ml); pour cet auteur, l'absence de D glucose conduit à une réduction de la phase de dépression, soit un état intermédiaire entre les phases A et B. Nous pouvons cependant remarquer que pour le D xylose dont les bains de préincubation ne contiennent aucun sucre et pour le D glucose dont les bains contiennent ce sucre à la concentration de 0,5mg/ml, nous avons observé la disparition de l'action initiale de la STH (Chapitre VI, Tableaux XVIII et XIX).

Pour HJALMARSON, les inhibiteurs de la synthèse protéique diminuent la captation du D xylose. L'addition de STH à l'inhibiteur annule cette diminution : l'effet de l'association STH + inhibiteur représente plus l'annulation de l'effet déprimant de l'inhibiteur par l'hormone que le maintien de l'activité que l'hormone possède en temps bref. En trois heures, nous observons des variations dans le même sens que nous reportons ci-dessous :

	Cycloheximide		Puromycine
	Captation du D xylose pourcent. D/T	Captation du D glucose pourcent.D/T	Captation du D xylose en pourcentage D/T
ıhibiteur/Témoin	98,5	98,6	88,3
ıhibit.+STH+Théo / STH+Théo	110,6		
ıhibit. + STH / STH		115,2	98,0
Différence	+ 12,1	+ 16,6	+ 9,7

dans le même sens que nous reportons ci-dessous :

par l'hormone que le maintien de l'activité que l'hormone possède
en temps bref. En trois heures, nous observons des variations

	Captation du D xylose pourcent. D/T	Captation du D glucose pourcent. D/T	Captation du D xylose en pourcentage D/T
[illegible]	98,2	[illegible]	[illegible]
[illegible] STH+Théo	110,4		
[illegible]			

Ainsi dans certains essais nous retrouvons que la STH peut augmenter la captation des sucres en temps long grâce à l'action des inhibiteurs de synthèse protéique.

Nous avons déjà rapporté que les actions que nous voyons sont plus faibles que celles observées par HJALMARSON, nos résultats étant plus comparables à ceux de JUSKOWITZ (1971). Cet ensemble d'actions faibles et d'effets "glucose" peut expliquer l'absence relative d'actions positives observées.

Nous avons vu que la STH en une heure augmente l'AMPc et qu'en trois heures l'hormone n'a plus d'action, soit l'inverse des résultats de FAIN et GOODMAN qui observent une action seulement en trois heures sur le tissu adipeux.

En trois heures, la STH avec la cycloheximide n'entraîne pas une augmentation de l'AMPc, mais une captation accrue de D glucose, nous trouvons une divergence entre ces deux paramètres. La théophylline n'a pas d'action ce qui semble de nouveau exclure une relation entre la STH et l'AMPc en temps long sur la captation des sucres.

Sur le tissu adipeux, FAIN et GOODMAN avaient émis l'hypothèse que l'action de la STH passait soit par une activation de l'adénylcyclase, soit par une inhibition de la phosphodiestérase, mais n'ayant pu retrouver de variations de l'AMPc sur les cellules musculaires, nous semble exclure l'un ou l'autre de ces mécanismes.

L'action à long terme de la STH se traduisant par une économie des glucides avec mobilisation des lipides, la STH peut donc ne plus avoir d'effet sur les mécanismes provoquant une utilisation des glucides c'est-à-dire une action par l'AMPc sur les cellules musculaires, mais au contraire induire la mobilisation des acides gras par l'AMPc dans le tissu adipeux.

La STH possèderait une action sur deux tissus différents passant par la même voie mais différée dans le temps : sur le muscle l'action serait rapide; sur l'adipocyte, elle nécessiterait un certain délai.

En temps long la STH n'agit pas par l'AMPc. Les inhibiteurs de synthèse protéique n'ont pas d'effet sur la perte d'activité de la STH sur la formation de l'AMPc mais sont capables dans certains cas de garder à l'hormone sa faculté de capter les sucres.

L'AMPc et le dibutyryl AMPc eux-mêmes perdent leur activité dans le temps. Les inhibiteurs de synthèse protéique ne leur conservent pas cette action et la puromycine même l'inverse en trois heures.

Cette inactivation dans le temps peut être rapprochée de celle observée par MANGANIELLO et coll. (1971). Sur des cellules grasses isolées, ces auteurs observent, après action de l'adrénaline ou de l'ACTH, une augmentation de l'AMPc, puis malgré la présence continue des hormones, ce taux diminue dans le temps alors que la production de glycérol reste élevée. Une addition supplémentaire de l'une des hormones n'est pas capable de provoquer un deuxième pic d'AMPc. Pour ces auteurs, il se forme dans le milieu un composé (éliminable par lavage) qui empêche cette deuxième action des hormones. KAKIUCHI et RALL (1966) observent un fait similaire sur le cerveau de souris : une deuxième affusion d'adrénaline ou d'histamine ne peut provoquer une deuxième élévation d'AMPc. Pour ces auteurs, le responsable de cette inhibition est inconnu.

Nous sommes en présence d'un cas semblable, aux différences près que le taux d'AMPc extracellulaire est stable dans nos essais (le bain d'incubation est renouvelé entièrement lors du test de captation des sucres) mais c'est l'action elle-même qui disparaît. L'autre différence réside dans le fait que l'"inhibiteur " hypothétique n'est pas éliminable par lavage. Ces auteurs travaillent avec des cellules isolées et non sur un tissu qui, lui, est susceptible de retenir cet inhibiteur dans le milieu extracellulaire.

Nos essais conduisent aussi à penser que ce composé hypothétique formé ne résulte pas d'une synthèse protéique puisque les

inhibiteurs de cette synthèse renforcent plutôt l'inhibition. Les deux nucléotides en présence de puromycine abaissent la captation en 3 heures (en présence de cycloheximide les captations sont équivalentes entre les fragments "témoins" et "dosages", mais ce corps lui-même élève la captation). Cette action peut trouver une explication : l'AMPc ou son dérivé provoque une dégradation du glycogène donc une augmentation du glucose "libre", le gradient de concentration ainsi formé freine la pénétration d'où la différence observée. Nous avons vu que la puromycine (APPLEMAN et KEMI, 1966) était comme la théophylline un inhibiteur de la phosphodiestérase; en présence de ces deux corps la concentration intracellulaire des nucléotides serait plus élevée et une action sur le glycogène serait perçue.

L'effet nul en six heures serait dû à l'épuisement des réserves de glycogène.

Conclusion

La perte d'activité de l'hormone sur la formation de l'AMPc et des nucléotides sur la captation des sucres ne sont pas modifiées par ces inhibiteurs de la synthèse protéique.

La prolongation des effets de la phase A de l'action de la STH, n'est pas dûe au maintien d'un taux élevé d'AMPc par les inhibiteurs de la synthèse protéique.

QUATRIEME PARTIE

ACTIONS DE LA STH, DU GLUCAGON ET DE L'INSULINE SUR LE DIAPHRAGME ISOLE DE RAT HYPOPHYSECTOMISE

C H A P I T R E XI

ACTION DE LA STH, DU GLUCAGON ET DE L'INSULINE SUR LE DIAPHRAGME ISOLE DE RAT HYPOPHYSECTOMISE

Une autre hormone provoque une captation accrue des sucres par les cellules, l'insuline, mais cette dernière a-t-elle une action sur l'AMPc ?

"However the question is far from closed"

écrit SUTHERLAND (1969) en guise de conclusion à ce sujet.

Les travaux de BUTCHER et coll. (1966)) montrent que l'insuline ne provoque pas une baisse du taux d'AMPc dans des adipocytes normaux, un effet inhibiteur peut cependant être perçu lorsque ce taux est élevé par action du glucagon ou des catécholamines. EXTON et coll. (1971) confirment ces travaux sur le foie, mais JEFFERSON et coll. (1968) avec un sérum antiinsuline, montrent que l'hormone abaisse le taux d'AMPc de façon permanente.

L'insuline a une action antilipolytique contraire à celle de l'AMPc, l'hormone est capable d'inhiber l'action du nucléotide mais non de son dérivé dibutyrylé (GOODMAN,1969a).

Le mécanisme par lequel l'insuline abaisse le taux d'AMPc est inconnu : elle n'inhibe pas l'adénylcyclase (BUTCHER et coll., 1966 - JUNGAS,1966 - RODBELL,1967b). Quant à la phosphodiestérase,

selon les auteurs elle est stimulée (BLECHER et coll.,1968 - HEPP et coll.,1969,1970) ou elle est inhibée (MULLER-OBERLINGHAUSEN et coll.,1968 - GOODMAN,1969a).

L'effet stimulant de l'insuline sur le transport des sucres n'est pas en relation avec un changement du taux intracellulaire de l'AMPc (RODBELL,1967b - PARK et coll.,1968). L'insuline n'a pas d'effet sur l'AMPc des muscles squelettiques (GOLDBERG et coll.,1967) muscles chez lesquels le transport des sucres est assez élevé. Les hormones qui augmentent le taux de l'AMPc dans le tissu adipeux n'inhibent pas les effets de l'insuline sur le transport des sucres (RODBELL,1967b), ce fait est en faveur d'un manque de relation entre les variations de l'AMPc et le transport des sucres. Mais à ce sujet, il convient de rappeler nos expériences déjà décrites au chapitre V: l'AMPc et le dibutyryl AMPc augmentent la captation des sucres par le diaphragme isolé de rat hypophysectomisé . Les travaux d'EDELMAN et EDELMAN (1966), CHAMBAUT et coll. (1969), KITABCHI et coll. (1970), SCHIMMEL et GOODMAN (1971) montrent une relation possible entre l'AMPc et le transport des sucres.

Ces résultats contradictoires ont conduit ROBISON et coll. (1971) à émettre une hypothèse sur l'action de l'insuline : l'hormone pourrait augmenter le taux d'AMPc dans un petit compartiment de la cellule, séparé de l'ensemble du cytoplasme, ainsi les variations de ce compartiment passeraient inaperçues dans l'ensemble de la cellule. CAHILL (1971) pour expliquer la versatilité des réponses de l'insuline, évoque la possibilité de synthèse d'un second messager ou d'une série de messagers qui modifieraient la perméabilité cellulaire, ces seconds messagers n'étant pas connus. CAHILL rappelle qu'à faible dose, l'insuline circulante (inférieure à 10mμ/ml) se comporte comme un agent lipolytique comme l'AMPc, mais à forte dose elle est antilipolytique.

RELATIONS INSULINE-STH

L'hypophysectomie améliore le diabète du chien (HOUSSAY et BIASOTTI,1930), résultat confirmé in vitro par GOODMAN et Mac DONALD (1969) qui montrent que les effets métaboliques de l'insuffisance insulinique, sur le tissu adipeux du rat, peuvent être inversés par l'hypophysectomie. L'insulinémie de base est moins élevée chez les animaux hypophysectomisés que chez les sujets normaux (GOLD et coll.,1968), les premiers sujets étant plus sensibles à l'insuline.

Le traitement prolongé par la STH accroît l'insulinémie par suite de l'hyperglycémie résultante du blocage de l'utilisation du D glucose. Un diabète d'abord réversible, puis irréversible, est constaté après traitement prolongé et à doses massives par la STH (MAHLER et SZABO,1969 - ELSAIR et ROYER,1969 - ELSAIR,1970). Un animal totalement ou partiellement dépancréaté ou déjà diabétique réagit plus rapidement à l'effet diabétogène de la STH.

Les actions directes de la STH et de l'insuline sont étudiées par HJALMARSON (1968d). Cet auteur trouve que la STH (à 25µg/ml) est plus active que l'insuline (100 mUI/ml) sur la captation du D xylose, mais si l'action de la STH s'abolit dans le temps, celle de l'insuline se maintient. L'insuline ajoutée à la STH ne modifie pas la perte d'activité de cette dernière hormone.

Pour EASTMAN et GOODMAN (1971) le traitement de cellules adipeuses de rats hypophysectomisés par la collagénase, provoque une insensibilité de ces cellules à l'insuline. Au contraire, sur les cellules traitées de la même manière venant de rats normaux (ou des cellules non traitées de rats hypophysectomisés) l'insuline accroît la captation des sucres et inhibe la lipolyse induite par l'adrénaline. Dans certains cas, l'insuline peut donc agir différemment selon que les cellules proviennent de rats hypophysectomisés ou de rats normaux, cette différence pouvant être liée à l'adénylcylase.

RELATIONS GLUCAGON et AMPc

Le glucagon est l'autre hormone pancréatique qui règle le métabolisme glucidique. Il provoque une hyperglycémie d'origine hépatique (ROBISON et coll.,1968 - EXTON et coll.,1971) après augmentation de l'AMPc, activation de la phosphorylase et inhibition de la glycogène-synthétase hépatique. Une stimulation de la gluconeogenèse à partir du lactate est notée par EXTON et coll. (1966-1971), du pyruvate,du D fructose et du D galactose par GARCIA et coll. (1966).

Les actions du glucagon sur le métabolisme de l'AMPc dans les muscles sont plus discutées. Pour SUTHERLAND et RALL (1968), cette hormone n'a pas d'action sur les muscles squelettiques, mais pour LEVEY et EPSTEIN (1969), elle active l'adénylcyclase cardiaque. On retrouve les mêmes divergences quand on considère l'action du glucagon sur la captation du D glucose par le tissu musculaire. Cette captation est augmentée pour ELRICK et coll. (1955), VAN ITALLIE et coll. (1955), LEFEBVRE (1963). Pour INGLE et coll. (1953, DRURY et coll. (1954), cet effet n'est pas perçu. LEFEBVRE fait remarquer que ce problème est compliqué du fait de très nombreuses interférences (hyperglycémie d'origine hépatique, influence sur la tension artérielle, l'insuline, la diffusion du glucose dans les espaces extracellulaires ...).

Sur les cellules adipeuses cette captation est franchement accrue (HAGEN,1961). BUTCHER (1966), BUTCHER et coll. (1966) montrent que le glucagon n'a qu'un faible pouvoir sur la formation de l'AMPc par ces cellules : il ne semble pas y avoir ici, de corrélation entre la captation du sucre et le taux d'AMPc intracellulaire.

Techniques

On utilise les techniques de mesure de captation du glucose et de formation d'AMPc à partir de l'adénine ^{3}H-2. Les hormones sont testées à des doses couramment utilisées par divers auteurs, soit pour le glucagon 8µg/ml et pour l'insuline 80 m UI/ml. La STH est utilisée à la dose de 10µg/ml.

Pour les incubations de 3 ou 6 heures, le D glucose est présent dans les bains d'incubation à la concentration de 0,5mg/ml.

Résultats

Le tableau XXVII montre l'action de la STH,du glucagon et de l'insuline en 1 heure, en présence de théophylline sur la captation du D glucose, la formation de l'AMPc et "R".

Sur les tableaux XXVIII et XXIX sont reportés les résultats des actions de la STH et/ou de l'insuline en 1/2-1 h et 3-6h sur les mêmes paramètres mais en absence de théophylline.

Sur les tableaux XXVII et XXVIII nous pouvons voir que la STH et l'insuline augmentent aussi bien la captation du D glucose que la formation de l'AMPc (pour l'insuline les actions ne sont pas statistiquement significatives).

Le tableau XXIX fait apparaître que ces deux hormones perdent leurs actions en 3 ou 6 heures sur l'AMPc et "R". La figure 18 montre cette évolution dans le temps. L'action de l'insuline est plus précoce que celle de la STH, il en résulte qu'en une heure l'insuline en milieu STH abaissela captation du D glucose et la formation de l'AMPc. En 6 heures, l'hormone pancréatique seule baisse significativement le rapport "R".

L'association STH+insuline comparée au témoin non traité provoque une formation légèrement accrue de l'AMPc et de "R" en 1/2 1h et 3heures, en 6 heures elle est sans effet.

TABLEAU XXVII

Action de la STH (10µg/ml), de l'insuline (80 mUI/ml) et du glucagon (8µg/ml) en présence de théophylline (0,5mg/ml) sur la captation du ^{14}C D glucose (U) et la formation d'AMPc à partir d'adénine ^{3}H-2, par le diaphragme isolé de rat hypophysectomisé (incubation de 1 heure, 12 essais par expérience)

Composition du milieu d'incubation						Glucose capté en pourcentage D/T	AMPc en pourcent. D/T	"R"
Témoin			Dosage					
STH	insul.	glucag.	STH	insul.	glucag.			
-	-	-	+	-	-	108,5 ± 3,1*	120,3	120,1
-	-	-	-	+	-	112,2 ± 2,7**	109,3	118,4
-	-	-	-	-	+	108,0 ± 2,9*	105,3	121,2

* $P < 0,05$ ** $P < 0,01$

TABLEAU XXVIII

Action de la STH (10µg/ml) et de l'insuline (80m UI/ml) sur la captation du ^{14}C D glucose (U), la formation de l'AMPc à partir d'adénine ^{3}H-2et du rapport "R" par le diaphragme isolé de rat hypophysectomisé après des incubations de 1/2 h ou 1 heure

Composition du bain d'incubation				D glucose capté en pourcentage D/T		AMPc formé en pourcentage D/T		"R"	
Témoin STH	Témoin Ins.	Dosage STH	Dosage Ins.	1/2h	1 heure	1/2h	1 heure	1/2h	1 heure
-	-	+	-	107,7 ± 3,0* (12)	109,7 ± 3,1** (5)	116,8 ± 14,8 (10)	159,2 ± 17,5* (5)	124,9 ± 15,0 (10)	167,4 ± 21,7* (5)
-	-	-	+	105,4 ± 3,0 (12)	104,6 ± 4,3 (5)	148,5 ± 28,8 (8)	120,4 ± 14,0 (5)	153,8 ± 28,0 (8)	139,7 ± 23,4 (5)
-	+	+	+	101,5 ± 4,7 (12)	96,4 ± 2,5 (5)	85,9 ± 12,4 (10)	106,8 ± 21,9 (5)	81,6 ± 9,9 (10)	99,1 ± 19,1 (5)
+	-	+	+	97,5 ± 3,3 (12)	91,7 ± 2,5** (5)	122,8 ± 24,5 (10)	74,3 ± 6,0** (5)	102,6 ± 13,1 (10)	74,2 ± 5,9** (5)
-	-	+	+	107,6 ± 2,7 (12)	100,5 ± 5,7 (5)	118,8 ± 38,1 (10)	121,1 ± 19,4 (5)	118,4 ± 22,4 (10)	123,0 ± 15,4 (5)

( ) Nombre d'essais * $P < 0,05$ ** $P < 0,01$

TABLEAU XXIX

Action de la STH (10µg/ml) et de l'insuline (80 mUI/ml) sur la captation du ^{14}C D glucose (U), la formation de l'AMPc à partir de l'adénine $^{3}H_2$ et du rapport "R" par le diaphragme isolé de rat hypophysectomisé après des incubations de 3h et 6heures.

Composition du bain d'incubation				D glucose capté en pourcentage D/T		AMPc formé en pourcentage D/T		"R"	
Témoin STH	Témoin Ins.	Dosage STH	Dosage Ins.	3h	6h	3h	6h	3h	6h
-	-	+	-	99,7 ± 3,0 (12)	103,5 ± 2,5 (6)	82,1 ± 21,6 (6)	104,1 ± 23,7	84,1	93,8
-	-	-	+	106,0 ± 3,8 (12)	116,5 ± 5,9** (6)	94,8 ± 13,1 (6)	89,3 ± 16,7	87,8	77,0*
+	-	+	+	109,5 ± 4,7 (12)	107,4 ± 4,5 (6)	123,7 (6)	101,4 ± 12,1	129,2	114,7
-	+	+	+	103,3 ± 4,5 (12)	95,5 ± 6,4 (6)	123,7 (6)	116,9 ± 25,3	123,7	132,8
-	-	+	+	108,2 ± 3,6* (12)	110,0 ± 5,1** (6)	117,5 ± 33,5 (6)	89,3 ± 16,6	118,6	101,3

( ) Nombre d'essais * P <0,05 ** P <0,01

Pour "R" les chiffres sont le résultat du pourcentage D/T de la moyenne des déterminations individuelles et non de la moyenne des pourcentages D/T des déterminations.

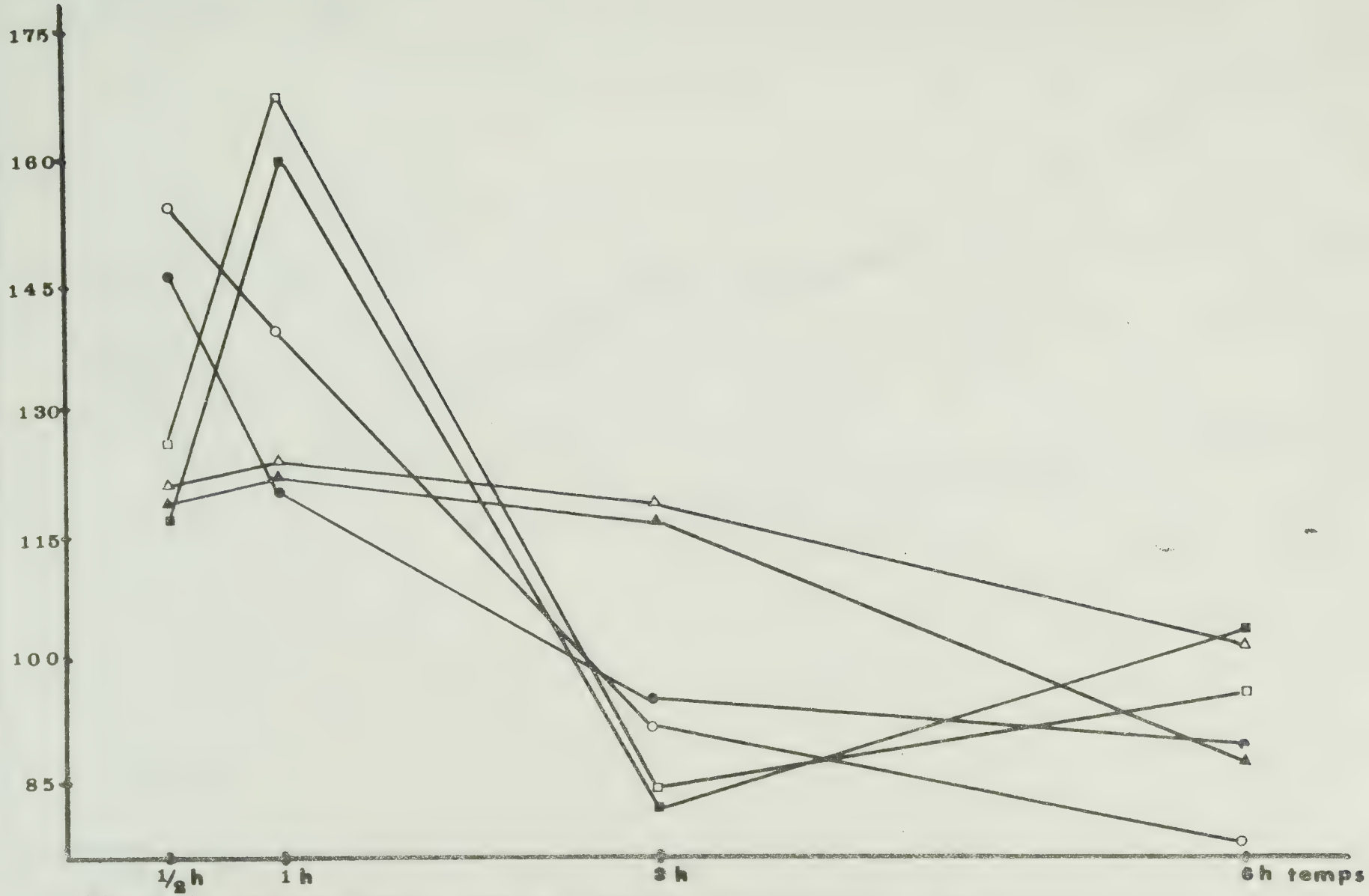


Figure 18 - Evolution dans le temps de l'AMPc sous l'influence de la STH (10µg/ml) ■—■ , de l'insuline (80mU/ml) ●—● et de l'association STH + insuline ▲—▲ . Evolution de "R" sous l'influence des mêmes hormones □—□ , ○—○ , △—△ , dans le diaphragme isolé de rat hypophysectomisé. (Valeurs en pourcentage par rapport à un témoin non traité).

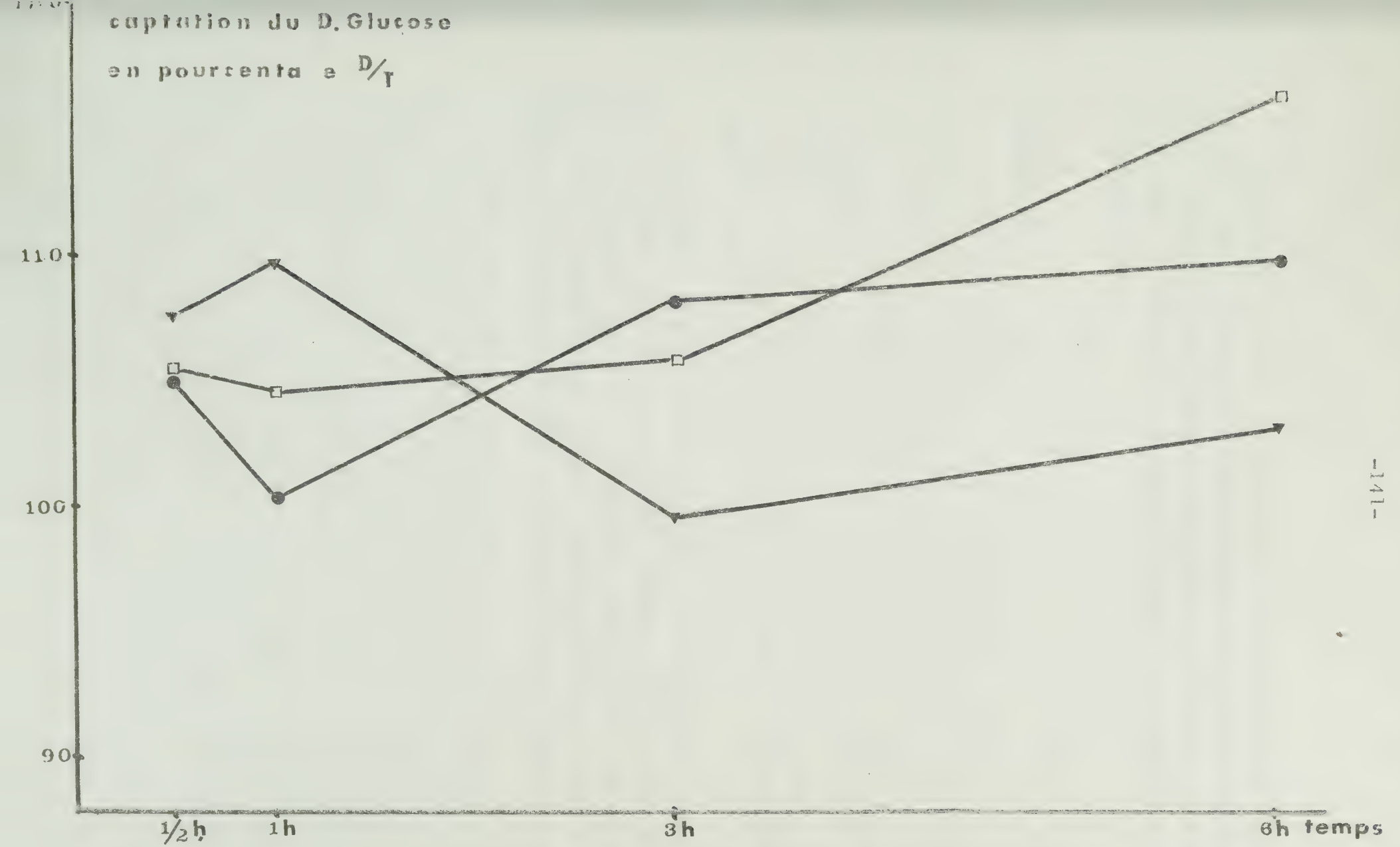


Figure 19 - Evolution dans le temps de la captation du ^{14}C D glucose (U) par rapport à un témoin non traité, sous l'influence de la STH (10µg/ml) ▼—▼ , de l'insuline (80mU/ml) ●—● et de l'association STH + insuline □—□ , par le diaphragme isolé de rat hypophysectomisé.

La figure 19 montre l'évolution de la captation du D glucose : la STH, nous l'avons déjà vu,après une phase d'augmentation n'a plus d'effet en 3 et 6 heures. Au contraire, l'action de l'insuline croît dans le temps, l'association STH+insuline suit l'action de l'insuline seule.

Discussion

Les théories rendant compte du phénomène de HOUSSAY sont nombreuses mais aucune n'est pleinement satisfaisante. Sur un animal entier l'adénylcyclase est peu ou pas du tout sensible à l'insuline (ROBISON), or nous trouvons, sur des animaux hypophysectomisés, que l'adénylcyclase est sensible à la STH et à l'insuline mais seulement durant une brève période de 1 heure. Après ce temps, la formation d'AMPc n'est plus modifiée et est même diminuée par l'insuline en 6 heures.

La STH en 3 ou 6 heures, n'a plus d'effet,on peut donc penser que l'hormone freine l'activité de l'adénylcyclase empêchant ainsi l'insuline d'agir. Or l'insuline seule, après une phase initiale d'augmentation, déprime l'AMPc (ce qui confirme la majorité des travaux antérieurs sur des tissus d'animaux normaux).

Ainsi chez l'animal normal, à STH et insuline plus élevées que chez l'animal hypophysectomisé, l'insuline aurait une activité nulle ou réduite sur la cyclase. Son effet sur la captation cellulaire du glucose ne pourrait résulter que de l'intervention du deuxième messager supposé par CAHILL. Chez l'animal hypophysectomisé, l'inhibition de la STH sur l'adénylcyclase étant levée, l'insuline, pour la captation des sucres, agit de deux manières : par son mécanisme propre et par l'augmentation de l'AMPc, soit dans l'ensemble de la cellule ou,comme le suppose ROBISON,dans une fraction de cette cellule.

La pluralité des recepteurs a été démontrée par le fait que certains types de cellules réagissent à plusieurs hormones : le foie, par exemple, réagit à l'adrénaline et au glucagon, le tissu adipeux répond à l'ACTH,à la STH, à l'adrénaline, au glucagon (MANGANIELLO et coll., 1971). De plus on peut bloquer par les inhibiteurs β l'action de la seule adrénaline. Sur le coeur, LEVEY et EPSTEIN (1969) envisagent l'existence d'une cyclase sensible à l'adrénaline et d'une autre sensible au glucagon. Dans le muscle de rat hypophysectomisé, nous pensons que deux adénylcyclases pourraient également coexister : l'une sensible à l'adrénaline, l'autre sensible à la STH et à l'insuline mais temporairement. Seule la première serait décelable chez l'animal entier, la seconde ne serait démasquée qu'après suppression de la source de STH, c'est à dire après hypophysectomie.

En une demi heure ou une heure, nous pouvons constater que l'addition de STH ou d'insuline à l'autre hormone n'augmente ni la captation du D glucose, ni la formation de l'AMPc, ni "R". Les deux hormones n'agissent pas en synergie mais au contraire l'une annule l'action de l'autre. Cette annulation d'effets en temps court est bien en relation avec l'hypersensibilité des animaux hypophysectomisés à l'insuline, ici l'expérience étant inverse. La STH agit comme inhibiteur de l'insuline sur les trois paramètres mesurés dans le diaphragme de rat hypophysectomisé.

Le fait que l'insuline en 1 heure diminue l'AMPc et "R" en présence de STH confirme les résultats déjà cités selon lesquels l'insuline n'est capable de déprimer l'AMPc que lorsque le taux du nucléotide est augmenté par une autre hormone, ici la STH.

L'effet de l'insuline sur la captation du D glucose ne se réduit pas dans le temps comme le montre ARVILL (1967) et pourtant son action sur l'AMPc se réduit. Ce résultat peut être rapproché des travaux de MANGANIELLO et coll. (1971) que nous avons mentionnés au chapitre précédent. L'adrénaline ou l'ACTH sur le tissu adipeux

produit un pic d'AMPc et malgré la présence continue de l'une des hormones, l'AMPc baisse, tandis que la production de glycérol reste élevée. Nous constatons avec l'insuline un phénomène très superposable : un pic bref d'AMPc, une action prolongée sur la captation du sucre.

Les effets du glucagon sont plus simples à expliquer : cette hormone est bien connue pour activer l'adénylcyclase du foie, des cellules adipeuses, du coeur, et pourpouvoir provoquer une captation accrue du sucre par certains tissus; nous retrouvons ces actions sur le muscle de rat hypophysectomisé.

Conclusion

L'insuline, en temps bref, augmente l'AMPc dans le diaphragme de rat hypophysectomisé. Cette action disparaît en une heure alors que l'hormone continue de provoquer une captation accrue de D glucose par le muscle pendant plus de 6 heures.

L'adjonction de STH à l'insuline fait perdre à cette dernière sa capacité d'augmenter en temps bref la formation d'AMPc par le muscle mais ne modifie pas son action sur la captation des sucres dans le temps.

En une heure, le glucagon en présence de théophylline augmente légèrement la formation de l'AMPc et la captation du D glucose par le muscle.

C I N Q U I E M E P A R T I E

ACTIONS DE DIFFERENTS IONS SUR LES EFFETS DE LA STH, LORS DE LA PHASE A

C H A P I T R E XII

ACTIONS DU CALCIUM

Dès que SUTHERLAND et ses collaborateurs ont proposé l'AMPc comme médiateur intracellulaire de l'action de différentes hormones il apparût nécessaire d'étudier l'action des facteurs susceptibles de modifier la polarisation membranaire ou l'activité enzymatique et plus particulièrement l'action du calcium.

Nous-mêmes, face aux résultats imprévus obtenus au chapitre VI avec le M2I, avons été conduits, connaissant d'autre part les actions complexantes de ce corps vis-à-vis du calcium, à tenter de préciser le rôle de cet ion au niveau du récepteur hormonal de la STH

Alors que la concentration du milieu extracellulaire est bien fixée à 10^{-4}, le calcium intracellulaire varie entre 10^{-5} à 10^{-8}.

Si pour certains, calcium et AMPc sont indépendants, de nombreux travaux font apparaître une relation entre eux et conduisent à formuler deux hypothèses :

- le calcium est nécessaire pour que le stimulus spécifique active l'adénylcyclase,
- l'AMPc fait pénétrer dans la cellule du calcium, lui-même est nécessaire à l'action du nucléotide.

Rapprochons de cette hypothèse celle de RASMUSSEN et TENENHOUSE (1968) : l'ATP sous forme lié au calcium est transformé en AMPc et en calcium ionisé. Le calcium ionisé serait le vrai médiateur des actions hormonales. Cette libération de calcium ionisé serait dûe à la différence de pouvoir complexant des deux nucléotides.

Dans un grand nombre de cas, le calcium n'est pas nécessaire pour que le stimulus provoque l'augmentation de l'AMPc mais la réponse physiologique à l'AMPc ne serait perçue qu'en présence de calcium. Voyons les travaux qui ont conduit à formuler ces hypothèses en commençant par les cas où le calcium semble indépendant des variations du taux d'AMPc.

1) INDEPENDANCE DE L'ADENYLCYCLASE VIS-A-VIS DU CALCIUM

Pour RASMUSSEN et NAGATA (1970) sur les tubules rénaux, en présence de calcium, la parathormone provoque une augmentation d'AMPc. Ce taux redevient normal en 15 minutes environ. En absence de l'ion, le taux de nucléotide reste stable après son augmentation initiale. L'ion extracellulaire n'influence pas l'activité de la cyclase.

HERMIER et JUSTISZ (1969) trouvent que si pour la biosynthèse de la progestérone sous l'action de la LH le calcium est nécessaire, l'ion n'interviendrait pas sur la formation de l'AMPc mais serait nécessaire à l'activation de la phosphorylase b kinase.

Pour NAMM et coll. (1968) sur le coeur perfusé de rat, le calcium n'est pas nécessaire à l'élévation de l'AMPc par l'adrénaline. Si KAKIUCHI et RALL (1969) montrent qu'une stimulation électrique provoque une accumulation d'AMPc, de même on sait que le calcium augmente dans le cytoplasme lors de la contraction musculaire et qu'il est nécessaire à l'activation de la phosphorylase b kinase. Dans les actions précitées, il n'y a donc pas de relation entre l'AMPc et le calcium, le nucléotide pouvant cependant favoriser la pénétration de l'ion.

2) DEPENDANCE DE L'ADENYLCYCLASE VIS-A-VIS DU CALCIUM

Dans d'autres cas, le calcium serait nécessaire à l'activité de la cyclase, donc à la formation de l'AMPc, mais souvent dans les travaux que nous mentionnons, il faut remarquer une influence très nette des doses du calcium : à faible dose il agit comme activateur mais à fortes doses il agit comme inhibiteur. Pour pouvoir opérer en milieu Ca = 0, les auteurs sont obligés de recourir à l'emploi de complexants de cet ion dont les actions sont loin d'être limitées à l'adénylcyclase.

LEFKOWITZ et coll. (1970), BAR et HECHTER (1969), FARESE (1971) trouvent que l'ACTH a besoin de calcium soit pour être fixé sur le récepteur, soit pour activer la cyclase. A concentration supérieure à 1mM et plus, l'ion inhibe l'activation de l'adénylcyclase par l'ACTH.

L'EGTA provoque une baisse de l'activité de la cyclase (BRADHAM et coll.,1970 - BÄR et HECHTER,1969). Paradoxalement, l'EGTA et le calcium à forte dose auraient donc la même action c'est-à-dire une dépression de l'activité de la cyclase.

10mM de calcium inhibentl'effet de l'ADH sur le flux osmotique de l'eau et la perméabilité à l'urée (ARGY et coll.,1967), au contraire le calcium est sans action sur le flux osmotique entraîné par la théophylline, l'AMPc et certains dérivés de l'ADH.

Le besoin en calcium des hormones pour pouvoir stimuler l'adénylcyclase semble en fait variable pour chaque hormone : pour KUO (1970) sur les cellules adipeuses, l'activité de la TSH nécessite la présence de calcium, le glucagon et la noradrénaline n'en ont pas besoin, l'ACTH n'en requiert que de petites doses.

Sur le foie, le calcium inhibe le glucagon (HEPP et coll., 1970a). Les complexants EGTA et EDTA n'ont pas d'action par eux-

mêmes, ils diminuent l'action de l'ACTH et de la TSH mais ne changent pas celles de la noradrénaline et du glucagon.

Les auteurs cités ci-dessus ont étudié l'action du calcium sur l'AMPc, quant à FRIEDMAN et PARK (1968) ils ont posé le problème en sens inverse. Le glucagon, l'adrénaline et la noradrénaline font sortir le calcium du foie perfusé de rat. Les auteurs expliquent cette sortie par la rupture et la transformation du complexe ATP-Ca en AMPc et calcium libre qui peut sortir de la cellule.

CALCIUM et PHOSPHODIESTERASE

Si le calcium peut intervenir dans la formation de l'AMPc, peut-il jouer un rôle dans la destruction du nucléotide ?

KAKIUCHI et coll. (1970a-b) ont mis en évidence deux systèmes de phosphodiestérase différents par leur sensibilité au calcium. L'un est indépendant du métal, l'autre nécessite un minimum de 2×10^{-5} de l'ion pour être activé. Ce dernier système est inhibé par l'EDTA ou l'EGTA.

WAI YIU CHEUNG (1971) observe que le calcium à faible dose stimule la phosphodiestérase de cerveau; à une dose supérieure à 1mM, l'enzyme est inhibée. Ce phénomène est assez parallèle à celui se produisant avec l'adénylcyclase.

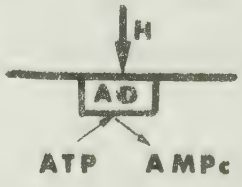
Rappelons que RASMUSSEN et NAGATA remarquent que le calcium provoque une diminution du taux d'AMPc après son augmentation initiale sous l'influence de la parathormone, cette diminution pouvant être due à une activation de la phosphodiestérase.

De l'ensemble de ces travaux, il ressort que les relations AMPc-calcium-effets biologiques sont variables suivant les types cellulaires, les hormones employées et surtout la concentration de calcium.

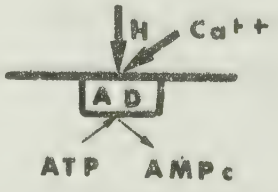
En général, l'absence de l'ion ou son large excès, provoque une inhibition de certaines hormones (surtout l'ACTH, très étudiée). Le calcium pour des taux compris environ de 0,2 à 1mM restaure ces activités; ces taux représentent une concentration nettement inférieure à celle du milieu extracellulaire qui est proche de 2,5mM.

TENENHOUSE et coll. (1969) ont émis diverses hypothèses sur les relations possibles entre le calcium et l'AMPc :

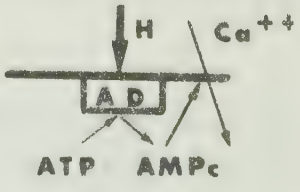
A/ L'hormone excite l'adénylcyclase qui transforme l'ATP en AMPc (concept du second messager)



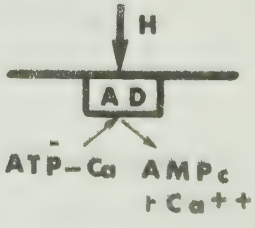
B/ L'hormone pour être fixée ou pour pouvoir exciter l'adénylcyclase a besoin de calcium.



C/ L'hormone augmente l'AMPc qui a son tour augmente la perméabilité à l'ion qui serait le vrai effecteur.



D/ L'hormone par l'intermédiaire de l'adénylcyclase rompt un complexe ATP-Ca en AMPc+Ca^{++}. L'ion serait le vrai effecteur.



Legende :

H = Hormone

AD = Adénylcyclase

Il est difficile de préciser la valeur de ces hypothèses, surtout d'expliquer l'inversion de l'effet du calcium en fonction de sa concentration.

Peut-être la superposition de deux phénomènes se réalise-t-elle À faible dose de calcium, selon l'hypothèse B, l'ion favoriserait la fixation de l'hormone sur l'adénylcyclase; à forte dose, selon l'hypothèse D l'excès de calcium dans le milieu extérieur tendrait à réduire la transformation du complexe ATP-Ca en AMPc+Ca^{++}.

CALCIUM ET CAPTATION DES SUCRES

Mises à part les relations entre l'AMPc et le calcium, que savons-nous des relations entre le calcium et le métabolisme des sucres ?

Un effet négatif fut observé par ZOR (1968) sur la thyroïde de chien. Des coupes incubées en absence de Ca^{++} ont une capacité d'oxydation du D glucose inférieure de 30 p.100 en moyenne par rapport à celles incubées en présence de l'ion.

Sur le muscle qui est notre milieu d'étude, BHATTACHARYA (1961) et LIEBECQ (1962) remarquent que le calcium diminue la captation du D glucose.

Un effet nul est noté par LETARTE et RENOLD (1969) sur des cellules grasses de souris, la concentration de calcium peut être multipliée par 4 sans que le transport ou le métabolisme du D glucose (mesuré par la production de CO_2, de glycérol et d'acides gras libres) soit affecté.

Sur notre milieu d'étude habituel, nous avons recherché si le calcium, par lui-même, ou associé à la STH, pouvait faire varier l'AMPc et la captation des sucres. Dans le chapitre suivant nous étudions le M2I et les complexants du calcium.

Techniques

Le calcium est employé à des doses de 2,5, 5 ou 7,5 mEq/l. Dans les milieux privés de cet ion, des quantités équivalentes de chlorure de sodium sont ajoutées pour respecter l'osmolarité.

Les techniques de mesure de captation des sucres et de l'appréciation de la formation de l'AMPc sont celles décrites au chapitre II "Méthodes et Matériels".

Résultats

Sur le tableau XXX sont reportées les variations de captation du D xylose, du D glucose et la formation d'AMPc (dosé selon la technique de BROOKER) entre des diaphragmes témoins et des diaphragmes traités par 2,5, 5 ou 7,5 mEq/l de calcium. La captation du D xylose est déprimée par les trois doses de l'ion, mais celle du D glucose est augmentée par les deux premières doses et reste inchangée avec la dose la plus forte. L'AMPc est abaissé par la présence de l'ion à toutes les doses. La figure 20 montre le parallélisme entre les variations de captation du D xylose et la formation de l'AMPc et non entre l'AMPc et de le D glucose (les captations du D glucose et les formations d'AMPc sont appréciées sur les mêmes diaphragmes).

Sur le tableau XXXI sont reportées les actions de la STH, de la théophylline et du calcium (5 mEq/l) sur la captation des deux sucres et sur l'AMPc mesuré par les deux méthodes utilisées. Nous voyons que le calcium, seul, en présence de STH ou de théophylline, abaisse la captation du D xylose et est sans influence nette sur le D glucose. La méthode de dosage de l'AMPc selon BROOKER montre que le taux du nucléotide est peu affecté, mais la méthode de KUO montre que l'ion diminue le rapport "R" du

TABLEAU XXX

Effets de différentes concentrations de calcium sur les captations du ^{14}C D xylose (U) du ^{14}C D glucose (U) et la formation de l'AMPc (méthode de BROOKER) par le diaphragme isolé de rats hypophysectomisés (incubation de 1h)

Calcium dans les bains d'incubation		Captation du D xylose en pourcentage D/T	Captation du D glucose en pourcentage D/T	AMPc en pourcent. D/T
Témoin	Dosage			
0	2,5 mEq/l	(6) 89,6 ± 7,1	(11) 105,9 ± 4,8	(11) 88,7
0	5 "	(6) 90,6 ± 3,4 *	(11) 107,4 ± 5,3	(11) 90,8
0	7,5 "	(6) 85,4 ± 2,5 **	(11) 100,7 ± 2,8	(11) 84,6

( ) Nombre d'essais * $P < 0,05$ ** $P < 0,01$

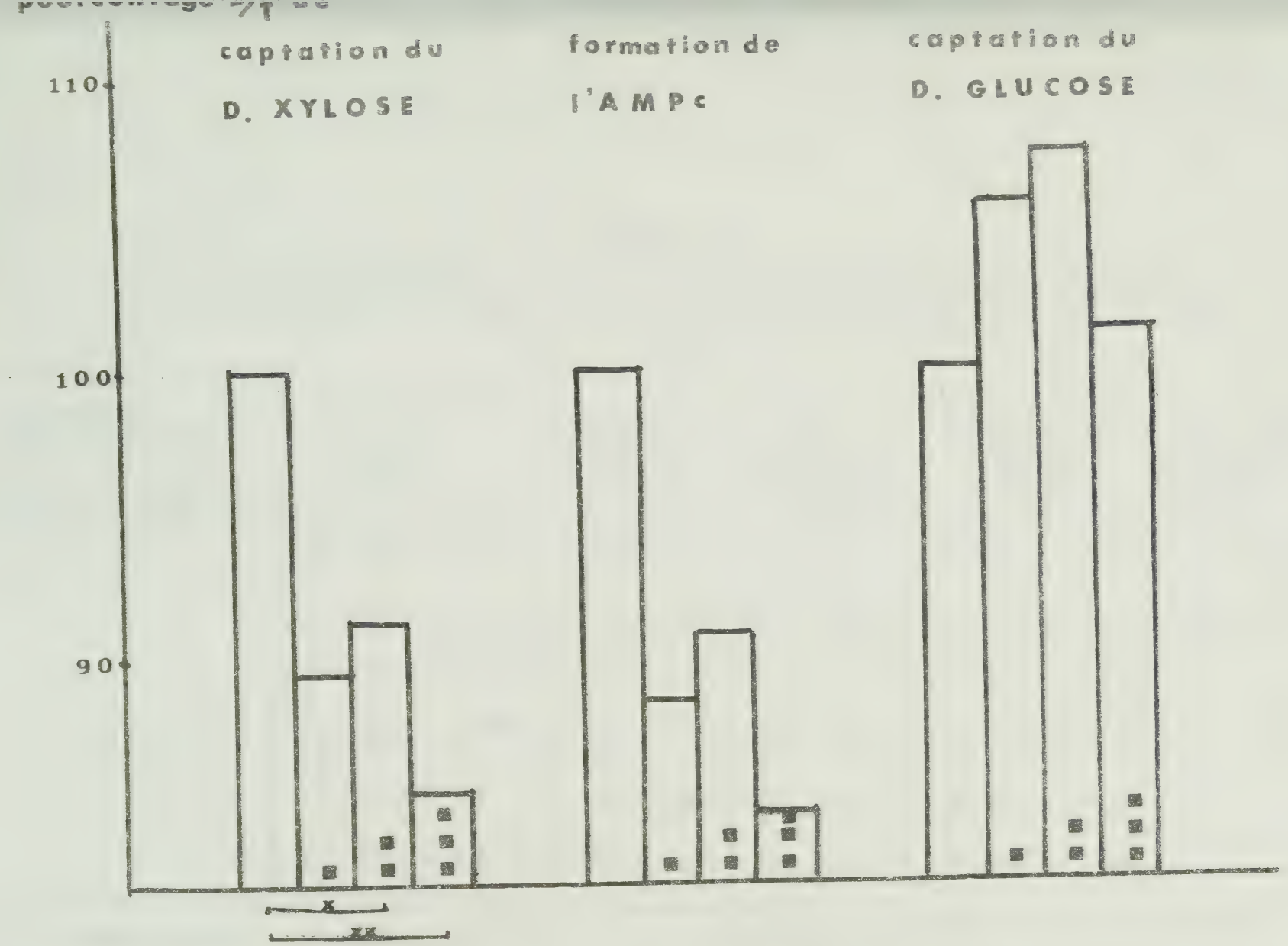


Figure 20 - Pourcentage Dosage/Témoin de captation du ^{14}C D xylose (U), du ^{14}C D glucose (U) de formation de l'AMPc (dose selon la méthode de BROOKER et coll.,1968) par le diaphragme isolé de rat hypophysectomisés sous l'influence de trois doses de calcium 2,5 mEq/l, 5 mEq/l et 7,5 mEq/l. ■ , ■ ■ , ■ ■ ■ . x $P < 0,05$ xx $P < 0,01$

TABLEAU XXXI

Action du calcium (5mEq/1), de la théophylline (0,5mg/ml), de la STH (5µg/ml) sur sur la captation du ^{14}C D xylose (U), du ^{14}C D glucose (U), la formation de l'AMPc dosée selon les techniques de BROOKER ou de KUO, par le diaphragme isolé de rat hypophysectomisé (Temps d'incubation 1h)

Composition du milieu d'incubation						Captation du D xylose en pourcent. D/T	Captation du D glucose en pourcent. D/T	AMPc en pourcent D/T (Technique de BROOKER)	Captation du D glucose en pourcent. D/T	AMPc formé en pourcent D/T (Technique de KUO)	"R"
Témoin			Dosage								
Ca	Théo	STH	Ca	Théo	STH						
-	-	-	+	-	-	(8) 89,6 ± 6,4*	(47) 106,0 ± 2,3	(24) 93,9	(18) 101,4 ± 2,7	(17) 100,6	(17) 96,0
-	-	-	-	-	+	(8) 106,9 ± 3,9	(6) 98,6 ± 8,4	(6) 117,5	(5) 91,1 ± 3,9	(5) 111,0	(5) 175,8
-	-	+	+	-	+	(8) 94,6 ± 4,6	(6) 96,5 ± 7,1	(6) 113,1	(6) 103,7 ± 6,9	(5) 83,2	(5) 53,8*
-	+	-	+	+	-	(8) 85,1 ± 4,0**	(6) 104,5 ± 5,3	(6) 111,2	(6) ; 100,0 ± 2,9	(4) 48,2	(4) 63,4
-	+	-	-	+	+	(8) 106,1 ± 3,4	(6) 98,6 ± 8,4	(6) 85,2	(6) 102,9 ± 2,0	(4) 76,7	(4) 77,3
-	+	+	+	+	+	(8) 91,4 ± 5,7	(6) 107,5 ± 4,9	(6) 206,9	(6) 105,3 ± 1,6*	(6) 178,3	(6) 160,1

( ) Nombre d'essais * $P < 0,05$ ** $P < 0,01$

TABLEAU XXXII

Influence du calcium (5mEq/l), de la STH (5µg/ml) et du méthyl 2 imidazole (10mg/ml) sur la captation du ^{14}C D glucose (U), du ^{14}C D xylose (U) et la formation de l'AMPc (dosé par la technique de BROOKER) par le diaphragme isolé de rat hypophysectomisé après une heure d'incubation.

Composition du milieu d'incubation						Captation du D xylose en pourcentage D/T	Captation du D glucose en pourcentage D/T	AMPc en pourcentage D/T
Témoin			Dosage					
Ca	S	M2I	Ca	S	M2I			
-	-	-	-	-	+	(6) 95,1 ± 6,6	(6) 120,5 ± 5,2**	89,7
+	-	-	+	-	+	(6) 117,9 ± 4,3**	(12) 105,8 ± 2,6	80,1
-	-	+	+	-	+	(14) 119,0 ± 4,8**	(12) 96,3 ± 1,8	99,8
-	-	+	-	+	+	(8) 94,7 ± 2,0*	(6) 94,1 ± 2,2*	134,1
+	-	+	+	+	+	(8) 86,5 ± 3,1**	(12) 99,4 ± 4,0	116,5
-	+	+	+	+	+	(8) 109,5 ± 3,6*	(6) 101,1 ± 4,8	100,0

( ) Nombre d'essais * $P < 0,05$ ** $P < 0,01$

fait d'une rétention d'activité tritiée accrue, l'AMPc lui-même n'est pas trop modifié.

La STH en milieu sans calcium n'a pas d'action sur la captation du D xylose, augmente l'AMPc (comme en milieu normal) mais diminue la captation du D glucose. La STH, en présence de théophylline et en absence de Ca^{++} n'a aucune action. Le calcium est capable de restaurer l'activité de l'association STH-théophylline sur la formation de l'AMPc et sur la captation du D glucose, mais déprime toujours celle du D xylose.

Discussion

Il ressort des résultats mentionnés aux tableaux XXX et XXXI que la captation du D xylose suit plus les variations de l'AMPc que ne le fait celle du glucose mais seulement en absence de théophylline. Ce composé ramène au contraire un parallélisme entre le D glucose et l'AMPc.

La captation du D glucose n'est que peu affectée par le calcium, contrairement aux résultats obtenus par LIEBECQ (1962), BATTACHARYA (1961) mais ces auteurs travaillent sur le muscle d'animaux normaux. Une différence entre les métabolismes des glucides de ces tissus peut être à l'origine de ces variations de résultats.

Les effets du calcium sont très complexes, nous voyons qu'en fait l'AMPc mesuré varie peu sous son influence contrairement au rapport "R". Or, nous considérons que ce rapport reflète en général mieux la balance d'activité entre l'adénylcyclase et la phosphodiestérase. Le calcium tend à ralentir l'efflux de la radioactivité tritiée de la cellule, d'où le fait que "R" est inférieur, en général, au rapport des taux d'AMPc entre les dosages

et leurs témoins. Cette rétention d'activité tritiée est en rappor avec l'hypothèse de RASMUSSEN et coll. qui suggèrent une complexation de l'ATP par l'ion. L'ATP ainsi retenu ne peut sortir de la cellule.

Les travaux antérieurs ont montré que le calcium pouvait avoir trois actions : être nécessaire à la fixation de l'hormone sur l'adénylcyclase, inhiber la cyclase ou activer la phosphodiestérase.

Le calcium seul abaisse"R", ce résultat n'indique pas l'enzyme affectée. En présence de STH, l'adénylcyclase est activé par l'hormone, "R" est abaissé par le calcium qui pourrait dans ce cas activer la phosphodiestérase. Lorsque cette dernière enzym est inhibée par la théophylline, "R" est diminué par l'ion; puisqu la phosphodiestérase est inhibée, le calcium inhiberait l'adénylcyclase.

Le calcium augmente "R" en présence de STH et de théophyllin l'ion pourrait fixer l'hormone sur le recepteur adénylcyclasique. Mais remarquons que la STH seule étant capable d'augmenter "R", l'action de l'ion n'est pas très nette.

Les actions du calcium, sur les enzymes responsables des ta d'AMPc,se superposent à d'autres : un effet direct de l'ion sur la captation,comme le montrent lesécarts entre l'AMPc et la captation du D xylose - un effet sur le métabolisme du D glucose intracellulaire pouvant, en créant des différences de gradient de concentration faire varier le passage du sucre.

En conclusion, nous trouvons que le calcium active la phosph diestérase ou inhibe l'adénylcyclase mais qu'il est cependant néce saire pour rendre la STH active sur la captation du sucre.

La faible solubilité des sels du calcium empêche d'augmenter la concentration de l'ion, nous allons étudier le problème en sen inverse en complexant le calcium par divers sequestrants.

C H A P I T R E XIII

ACTION DE COMPLEXANTS DU CALCIUM SUR LA CAPTATION DES SUCRES ET LA FORMATION DE L'AMPc PAR LES DIAPHRAGMES ISOLES DE RATS HYPOPHYSECTOMISES

L'imidazole et ses dérivés, à côté de leur pouvoir activateur de la phosphodiestérase,possèderaient une autre propriété, celle de complexer le calcium. Ainsi YU et coll. (1967) observent que cet ion est sequestré dans le réticulum sarcoplasmique par l'imidazole. Ce même corps cause une hypocalcémie chez le rat après administration intraveineuse ou orale (WELLS et LLOYD,1968). Cette hypocalcémie a lieu même après ablation des parathyroïdes et/ou de la thyroïde, indiquant que ces glandes ne sont pas nécessaires à son action.

L'imidazole qui agit sur la phosphodiestérase pourrait aussi être actif sur le calcium. REEDIJK (1969a,b - 1971a,b) dans une série de travaux démontre les effets complexants de dérivés de l'imidazole sur le calcium (et sur de nombreux autres métaux), cela nous conduit à penser que ces corps pourraient agir au niveau des compartiments calciques en formant des complexes. Cette sequestration pourrait expliquer la différence observée entre les résultats de KLEISBAUER et coll. (1968) et ceux de NAKANO et coll. (1970). Les hormones, nous l'avons déjà vu, ont des réactions parfois différentes en présence ou en absence de calcium.

Que l'ion seul diminue la formation de l'AMPc peut être le résultat de l'inhibition de la transformation de l'ATP-Ca en AMPc et de l'activation de la phosphodiestérase.

Que le calcium potentialise l'accumulation de l'AMPc sous l'action de la STH uniquement en présence de théophylline suggère que l'ion active à la fois la phosphodiestérase et l'action de l'hormone sur l'adénylcyclase (hypothèse B).

Les séquestrants peuvent avoir une double action : par inhibition de l'entrée de l'ion dans la cellule (hypothèse C) ou par complexation du calcium intracellulaire (hypothèse D). Les séquestrants devraient supprimer l'action du calcium sur la captation des sucres. Mais aussi, en libérant l'ATP de son complexe calcique, ces corps devraient augmenter l'AMPc et favoriser la captation des sucres. En fait, peu d'actions nettes ne sont observées surtout pour la captation du glucose : aux diverses actions contradictoires du calcium sur l'AMPc et sur la captation des sucres, viennent s'en ajouter d'autres,sur la glycogénolyse par exemple, les unes annulant les autres.

La multiplicité évidente des actions du calcium ressort des résultats obtenus, mais les techniques utilisées ici ne permettent pas de les préciser.

CONCLUSIONS GENERALES SUR L'ACTION DU CALCIUM ET DES SEQUESTRANTS

Au cours des deux chapitres précédents, nous avons observé les points suivants :

- le calcium a une faible action inhibitrice sur la formation de l'AMPc et s'il inhibe l'action de la STH seule, il potentialise l'action de cette hormone lorsque la phosphodiestérase est inhibée par la théophylline.

- pour la captation des sucres, le calcium n'influence que peu celle du D glucose et diminue celle du D xylose. L'ion modifie très peu les actions de la STH seule ou associée à la théophylline.

- les séquestrants du calcium ne sont pas capables de modifier les actions de l'ion sur les captations des deux sucres.

Comment rattacher ces résultats aux diverses hypothèses formulées au début du chapitre XII et que nous rappelons ici :

A- concept du second messager.

B- l'hormone pour être fixée ou pour pouvoir activer l'adénylcyclase a besoin de calcium.

C- l'hormone augmente l'AMPc qui à son tour augmente la perméabilité à l'ion qui serait le véritable effecteur.

D- l'hormone par l'intermédiaire de l'adénylcyclase rompt un complexe ATP-Ca en AMPc+Ca^{++}. L'ion serait l'effecteur réel.

E- le calcium empêche la formation de l'AMPc en inhibant la rupture du complexe ATP-Ca (hypothèse de RASMUSSEN).

F- le calcium est un activateur de la phosphodiestérase.

les deux autres l'augmentent. WAI YIU CHEUNG (1971), SIOUFI et coll. (1970) montrent que l'EGTA ou le citrate sont des inhibiteurs de la phosphodiestérase. Le M2I est un activateur d'où cette différence d'action des sequestrants sur le taux de formation de l'AMPc.

Quelles que puissent être les raisons des variations de l'AMPc, nous pouvons penser que ses variations ne modifient pas d'une façon notable la captation des sucres. Seules les variations de l'état d'ionisation du calcium peuvent retentir sur la captation des sucres et la formation de l'AMPc.

Nous retrouvons avec l'action des divers complexants la disparité d'action sur la captation du D xylose et du D glucose que nous avions observée précédemment lors de l'étude de l'action du calcium.

Les complexants à fortes doses (20 mEq/l) accroissent la captation du D glucose. Au chapitre XII, nous avons vu que la captation du D glucose est augmentée par une faible dose de Ca^{++} (2,5 mEq/l) et ne l'est plus pour une plus forte (7,5 mEq/l). Nous pouvons supposer qu'une dose encore plus forte : 20 mEq/l (essai impossible à réaliser à cause de la faible solubilité des sels calciques) diminuerait la captation, ainsi les complexants auraient les effets inverses du calcium à doses similaires.

Comme le fait ressortir le tableauXXXV, un excès de complexants (10 mEq/l de fluorure, citrate, EGTA ou EDTA pour 5 mEq/l de Ca^{++}) n'est pas capable d'empêcher l'ion de déprimer l'entrée du D xylose. Ces complexants, en large excès (20 mEq/l pour 5 mEq/l de Ca^{++}) ainsi que les trois dérivés imidazolés annulent l'effet de l'ion et même avec le méthyl 2 imidazole, son effet est inversé. Les actions de ces complexants semblent être en relation avec leur concentration, leur pouvoir de complexation, leur passage à travers la membrane cellulaire.

Les variations de l'AMPc et du rapport "R" sont complexes. En effet, l'EGTA provoque une sortie très importante de radioactivité tritiée (action comparable à celle du M2I), le citrate a la même action, moins forte cependant. De ce fait, les variations de l'AMPc et de "R" peuvent avoir la même origine que celle observée à propos du m2I. La complexation intracellulaure du calcium entraînerait une sortie de l'ATP de la cellule. Une différence notable entre le M2I d'une part, et le citrate et l'EGTA d'autre part, peut être notée : le premier corps diminue l'AMPc

Des résultats reportés sur le tableau XXXV, il ressort que, malgré la présence des complexants, le calcium garde la faculté de faire baisser la captation du D xylose. Pour le D glucose, le calcium n'a pas d'action. Une seule action inverse s'observe en présence de M2I : le calcium augmente la captation du D xylose mais pas celle du D glucose.

Discussion

Le pouvoir complexant du M2I vis-à-vis du calcium peut être à l'origine de la divergence entre le taux d'AMPc et le rapport "R" que nous avons signalée au chapitre VI. Nous avons vu que ce corps provoque un départ accéléré de la radioactivité liée à l'adénine. L'ATP lié sous forme de complexe calcique est fixé à la membrane (RASMUSSEN et TENENHOUSE,1968), mais libre, il peut la passer (difficilement mais SHIMIZU et coll., 1969 - KUO et DE RENZO,1969, ont réalisé leurs premiers dosages non avec de l'adénine mais avec de l'ATP montrant que ce corps passait la membrane). Nous savons, par ailleurs, que l'AMPc passe mal la membrane. L'explication pourrait être que le M2I libérant l'ATP de son complexe peut accroître ainsi sa mobilité, d'où ce flux sortant de tritium. L'AMPc, non complexé, n'est pas soumis, ou du moins faiblement, à ce mouvement dû à une différence de complexation. La diminution de l'AMPc serait liée au triple phénomène de départ du substrat (ATP), de sa propre diffusion et de sa destruction par la phosphodiestérase. Le rapport "R" est augmenté à cause de la fuite d'ATP très supérieure à celle de l'AMPc.

TABLEAU XXXV

Influence du calcium (5mEq/l) en milieu complexant sur la captation du ^{14}C D xylose (U) ou du ^{14}C D glucose (U) et la formation de l'AMPc par les diaphragmes isolés de rats hypophysectomisés

(Incubation 1h)

Composition du milieu d'incubation		Captation des sucres en pourcentage Dosage/Témoin						AMPc pourcent.D/T	"R"
Témoin	Dosage	D xylose concent. des complex.			D glucose concent. des complex.				
F^-	Ca + F	+	(6)	93,6 ± 7,6	++	(6)	96,0 ± 4,0		
EDTA	Ca + EDTA	+	(6)	89,3 ± 1,7**					
EDTA	Ca + EDTA	++	(6)	96,0 ± 4,0	++	(6)	103,4 ± 3,7		
EGTA	Ca + EGTA	+	(6)	89,7 ± 7,2*	++	(6)	102,6 ± 4,6	175,1 K	115,4
citrate	Ca + citrate	+	(6)	87,6 ± 3,6**	++	(6)	97,0 ± 3,9	110,7 K	87,0
Imidazole	Ca + Imidazole	+++	(6)	95,8 ± 5,3	+++	(6)	99,3 ± 2,8		
Méthyl 1 imidazole	Ca + Méthyl 1 imidazole	+++	(6)	100,3 ± 3,1	+++	(6)	103,0 ± 4,2		
Méthyl 2 imidazole	Ca + Méthyl 2 imidazole	+++	(14)	119,0 ± 4,8**	+++	(12)	96,5 ± 1,7	99,8 B	

( ) Nombre d'essais

* $P < 0,05$ ** $P < 0,01$

\+ Produits employés à la dose de 10 mEq/l
++ " " 20 mEq/l
+++ " " 10 mg/ml

B AMPc dosé par la technique de BROOKER
K " " " KUO

TABLEAU XXXIV

Influence des complexants en milieu calcique (5mEq/l) sur la captation du ^{14}C D xylose (U) ou du ^{14}C D glucose (U) et la formation de l'AMPc par les diaphragmes isolés de rats hypophysectomisés (incubation de 1h)

Composition du milieu d'incubation		Captation des sucres en pourcentage Dosage/Témoin				AMPc pourcent.D/T	"R"
		concent. des complex.	D xylose	concent. des complex.	D glucose		
Ca	Ca + F^-	+	(6) 100,1 ± 5,6	++	(6) 114,8 ± 5,3*		
"	" + EDTA	+	(6) 106,2 ± 3,3				
"	" + EDTA	++	(6) 114,2 ± 5,1*	++	(6) 128,8 ± 4,7**		
"	" + EGTA	+	(6) 102,6 ± 4,8	++	(6) 108,1 ± 8,0	114,9 K	137,2
"	" + citrate	+	(6) 97,5 ± 3,4	++	(6) 101,6 ± 3,3	123,2 K	135,0
"	" + imidazole	+++	(6) 110,7 ± 4,7	+++	(6) 117,3 ± 6,7*		
"	" + méthyl 1 imidazole	+++	(6) 114,3 ± 3,5**	+++	(6) 111,7 ± 4,7*		
"	" + méthyl 2 imidazole	+++	(14) 117,9 ± 4,3**	+++	(12) 105,9 ± 2,5	(6) 85,7 B	

( ) Nombre d'essais

* $P < 0,05$

** $P < 0,01$

\+ Produits employés à la dose de 10 mEq

++ " " 20 mEq

+++ " " 10 mg/ml

B AMPC dosé par la technique de BROOKER

K " " " KUO

TABLEAU XXXIII

Influence des complexants en milieu non calcique sur la captation du ^{14}C D xylose (U) ou du ^{14}C D glucose (U) et la formation de l'AMPc par les diaphragmes isolés de rats hypophysectomisés (Incubation 1h)

Composition du milieu d'incubation		Captation des sucres en pourcentage Dose/Témoin				AMPc formé pourcent.D/T	"R"
Témoins	Dosages	concent. des complex.	D xylose	concent. des complex.	D glucose		
0	F	+	(6) 96,5 ± 3,7	++	119,8 ± 5,1**		
0	EDTA	+	(6) 110,0 ± 1,9**				
0	EDTA	++	(6) 108,6 ± 2,8*	++	109,3 ± 4,6		
0	EGTA	+	(6) 105,1 ± 4,1	++	100,4 ± 4,4	60,2 K	111,3
0	citrate	+	(6) 101,2 ± 2,3	++	109,8 ± 6,3	153,4 K	159
0	imidazole	+++	(6) 108,7 ± 2,9**	+++	116,1 ± 2,9**		
0	méthyl 1 imidazole	+++	(6) 112,0 ± 6,2	+++	124,4 ± 4,9**		
0	méthyl 2 imidazole	+++	(14) 95,0 ± 6,6	+++	120,6 ± 5,2**	89,7 B	

( ) Nombre d'essais * P < 0,05 ** P < 0,01

\+ Produits employés à la dose de 10 mEq
++ " " 20 mEq
+++ " " 10 mg/ml

B AMPc dose par la technique de BROOKER
K " " " KUO

Résultats

Le tableau XXXII montre les actions du M2I,du calcium et de la STH diversement associés. Comme avec la théophylline, nous trouvons de profondes divergences entre les captations du glucose ou du xylose et la formation de l'AMPc. La principale, que nous ayons déjà observée, est l'effet totalement différent du M2I sur le D xylose et sur le D glucose: en milieu calcique, le D xylose est fortement capté, le D glucose ne l'est que faiblement, l'AMPc est abaissé. En milieu non calcique le M2I ne provoque pas une captation accrue du D xylose, mais au contraire augmente celle du D glucose, l'AMPc étant toujours diminué. L'effet propre du calcium en présence de M2I montre bien cette différence, il augmente dans ces conditions, la captation du D xylose d'une manière très sensible mais ne touche pas celle du glucose, ni la formation de l'AMPc. En présence de M2I et de STH, le calcium de nouveau provoque une captation accrue du D xylose mais ne touche pas celle du D glucose, ni la formation de l'AMPc. En présence de M2I et en absence de Ca la STH diminue la captation des deux sucres mais augmente la formation de l'AMPc.

Les tableaux XXXIII, XXXIV et XXXV montrent respectivement l'action des sept sequestrants, en absence de calcium, en présence de calcium et l'action du calcium en présence des sequestrants.

Sur le premier des trois, nous voyons qu'en absence de calcium l'EDTA aux deux doses testées et l'imidazole augmentent la captation du D xylose, pour le D glucose le fluorure et les trois dérivés imidazolés sont actifs, le citrate augmente l'AMPc et le rapport "R".

En présence de calcium (tableau XXXIV), les complexants à la dose de 10 mEq/l sont inactifs, il faut de fortes doses de ces corps pour avoir des actions significatives (le citrate de sodium même à forte dose est inefficace). L'EGTA et le citrate augmentent l'AMPc.

Les dérivés imidazolés complexeraient plus ou moins l'ion, les différences observées seraient plus un reflet de l'état d'ionisation du métal que de l'activité propre de ces corps sur la phosphodiestérase et de la sensibilité des hormones vis-à-vis du calcium. La différence observée sur la lipolyse induite par la théophylline, par KLEISBAUER et NAKANO, pourrait avoir la même explication. Le premier auteur travaille dans un milieu de "Krebs Ringer contenant la moitié du calcium recommandé" , tandis que le second est muet sur la composition exacte du milieu utilisé qui doit être de concentration normale en calcium.

Nous avons étudié l'action de sept sequestrants du calcium (Fluorure, EDTA, EGTA, citrate, imidazole, méthyl 1 imidazole et méthyl 2 imidazole) sur la captation des sucres par le diaphragme isolé de rat hypophysectomisé. Pour le M2I nous avons en plus étudié son action vis-à-vis de la STH en présence ou en absence de calcium.

Technique

Les techniques habituelles de captation des sucres et de mesure de l'AMPc sont utilisées.

Le fluorure, l'EDTA, l'EGTA ou le citrate sont employés aux doses de 10 ou 20 mEq/litre.

Dans les bains privés ou de ces complexants ou de calcium, des quantités équivalentes de chlorure de sodium sont ajoutées.

Les dérivés imidazolés sont présents à la dose uniforme de 10mg/ml. Seule l'absence de calcium est compensée par du chlorure de sodium.

C H A P I T R E XIV

ACTION DU MAGNESIUM ET DE LA STH SUR LA CAPTATION DES SUCRES ET SUR LA FORMATION DE L'AMPc PAR LE DIAPHRAGME ISOLE DE RAT HYPOPHYSECTOMISE

SUTHERLAND rapporte que le magnésium est un ion nécessaire à l'action de l'adénylcyclase, aussi avons-nous cherché le rôle que pouvait jouer cet ion sur la captation des sucres et l'action de la STH sur le diaphragme isolé de rat hypophysectomisé.

En fait, peu d'auteurs ont étudié ses effets. En absence de complexants spécifiques, il est difficile de séparer son action de celle du calcium, ces ions étant des composants essentiels du milieu intracellulaire, nécessaires au fonctionnement de la cellule.

Ces deux corps possèdent de nombreuses propriétés chimiques communes, à la fin de ce chapitre nous comparerons les effets de ces deux ions sur la captation des sucres et la formation de l'AMPc.

Voyons les actions relatives du magnésium vis-à-vis des mécanismes où l'AMPc joue un rôle. Pour LETARTE et RENOLD (1969a), la suppression du magnésium dans le milieu extracellulaire ne fait pas varier la production du CO_2, des acides gras libres et du glycérol par les cellules adipeuses de souris, en présence ou en absence d'insuline.

Pour ØYE et SUTHERLAND (1966), le magnésium mis au contact d'érythrocytes de dindon ne provoque pas d'augmentation de l'AMPc.

A côté de cette inactivité, des actions négatives du magnésium furent trouvées. Ainsi pour MOSINGER et VAUGHAN (1967a-b) la lipolyse induite par l'AMPc est augmentée par l'absence de magnésium dans le milieu d'incubation. Dans un travail très voisin, WADE et coll. (1970) trouvent que le magnésium inhibe la production des acides gras libres tant sur des fragments de contrôle que ceux traités par l'adrénaline.

Le travail d'ARGY et coll. (1967) les conduit à la conclusion que le magnésium abaisse la formation de l'AMPc mais qu'il n'agit pas sur l'action du nucléotide. Huit millimoles de magnésium inhibent le flux osmotique de l'eau et de l'urée provoqué par l'ADH, divers dérivés synthétiques de l'ADH et la théophylline.

Le magnésium possède aussi des actions positives:pour HEPP et coll. (1970), il rend plus réceptive l'adénylcyclase hépatique au glucagon et pour HERMIER et JUSTISZ (1969), après action de l'EDTA sur l'ovaire de la ratte pseudogestante, le magnésium serait plus efficace que le calcium pour rétablir l'action de la LH sur la synthèse de la progestérone.

Pour RASMUSSEN et TENENHOUSE (1968), l'effet de l'ion est double. A 5 mEq/l, il diminue la formation de l'AMPc pour la glande parotide de rat alors qu'il potentialise fortement l'action de l'adrénaline sur cette même glande. Ces résultats sont intéressants montrant que le magnésium comme le calcium peut diminuer l'AMPc mais être nécessaire à l'action de certaines hormones.

L'ion peut agir également sur la phosphodiestérase. Ainsi pour SUTHERLAND et RALL (1962), BUTCHER et SUTHERLAND (1962), KUKOVETZ et POECH (1967) le magnésium active cette enzyme.

Nous avons recherché si cet ion pouvait intervenir sur la captation des sucres en relation avec l'AMPc et s'il pouvait modifier l'action de la STH.

Résultats

Sur les tableaux XXXVI et XXXVII sont reportés les résultats de formation de l'AMPc à partir de l'adénine ^{3}H-2, de captation du D glucose et du D xylose, sous l'influence de la STH,du magnésium, de la théophylline et du M2I.

A la dose de 20 mEq/l le magnésium diminue la formation de l'AMPc et abaisse la captation du D xylose; celle du D glucose n'est que peu affectée. A forte dose (60 mEq/l) le magnésium ne provoque plus d'effet sur les trois facteurs mesurés.

La STH, en absence de magnésium, n'a pas d'action sur la captation des sucres et il y a diminution de la formation de l'AMPc.

La STH, en présence de magnésium, retrouve son action sur la formation de l'AMPc et sur la captation du D glucose. Son effet reste nul vis-à-vis de la captation du D xylose.

Les essais de potentialisation de l'action de la STH par la théophylline conduisent à des résultats négatifs sur la captation du D glucose alors que de nouveau,pour le D xylose,les résultats trouvés en milieu de Krebs normal sont vérifiés. La STH en présence de théophylline n'augmente l'AMPc qu'en présence de magnésium.

En présence de M2I, le magnésium n'affecte pas les résultats trouvés en milieu de Krebs normal. La captation du D xylose est augmentée par le M2I; la STH en présence de M2I inhibe cette captation sans que le magnésium modifie ces actions. La formation de l'AMPc n'est guère modifiée pas plus que la captation du D glucose.

TABLEAU XXXVI

Action de la STH (5µg/ml), du magnésium (20mEq/l) et de la théophylline (0,5mg/ml) sur la captation du ^{14}C D glucose (U) et du ^{14}C D xylose (U) et la formation de l'AMPc à partir de l'adénine ^{3}H-2 par le diaphragme isolé de rat hypophysectomisé (Incubation 1h)

Composition du milieu d'incubation						D xylose capté en pourcentage D/T	D glucose capté en pourcentage D/T	AMPc formé en pourcentage D/T	"R"
Témoin			Dosage						
Mg	S	Théo	Mg	S	Théo				
-	-	-	20mEq	-	-	(24) 95,2 ± 1,9*	(12) 100,2 ± 3,1	(12) 72,9**	(2) 81,6
-	-	-	40mEq	-	-	(6) 92,1 ± 4,1	(6) 103,3 ± 2,0	(6) 99,9	(6) 101,7
-	-	-	60mEq	-	-	(6) 96,6 ± 2,0	(6) 106,3 ± 5,1	(6) 119,6	(6) 125,8
-	-	-	-	+	-	(6) 101,3 ± 4,9	(6) 103,7 ± 3,1	(6) 73,6**	(6) 76,5
-	+	-	+	+	-	(6) 100,0 ± 6,3	(6) 107,9 ± 3,1*	(6) 159,0**	(6) 125,9
+	-	-	+	+	-	(6) 102,5 ± 2,3	(6) 109,8 ± 2,9*	(6) 178,0**	(6) 130,6
-	-	+	+	-	+	(6) 94,2 ± 7,7	(11) 106,3 ± 3,6	(11) 88,9	(11) 100,0
-	-	+	-	+	+	(6) 111,7 ± 3,0*	(11) 106,7 ± 4,1	(11) 103,5	(11) 107,8
+	-	+	+	+	+	(6) 110,1 ± 3,3*	(11) 97,5 ± 1,6	(11) 141,8*	(11) 130,6
-	+	+	+	+	+	(6) 96,1 ± 2,5	(11) 99,0 ± 2,2	(11) 121,8	(11) 121,0

( ) Nombre d'essais * $P < 0,05$ ** $P < 0,01$

TABLEAU XXXVII

Action de la STH (5µg/ml), du magnésium (20mEq/l) et du méthyl 2 imidazole (M2I, 10mg/ml) sur la captation du ^{14}C D glucose (U) et du 14C D xylose (U) et la formation de l'AMPc à partir de l'adénine ^{3}H-2 par le diaphragme isolé de rat hypophysectomisé (incubation 1h)

Composition du milieu d'incubation						D xylose capté en pourcentage D/T	D glucose capté en pourcentage D/T	AMPc formé en pourcentage D/T	"R"
Témoin			Dosage						
Mg	S	M2I	Mg	S	M2I				
-	-	+	+	-	+	(12) 100,3 ± 2,5	(6) 110,8 ± 4,4*	(6) 127,4	(6) 84,6
-	-	+	-	+	+	(6) 87,2 ± 2,8**	(6) 104,2 ± 2,5	(6) 110,7	(6) 105,9
+	-	+	+	+	+	(6) 89,3 ± 2,8**	(6) 93,3 ± 3,2	(6) 112,5	(6) 115,2
-	+	+	+	+	+	(6) 103,0 ± 1,2	(6) 98,8 ± 2,5	(6) 129,5	(6) 92,6
-	-	-	-	-	+	(6) 113,8 ± 3,9*			
+	-	-	+	-	+	(6) 123,8 ± 4,2**			

( ) Nombre d'essais * P < 0,05 ** P < 0,01

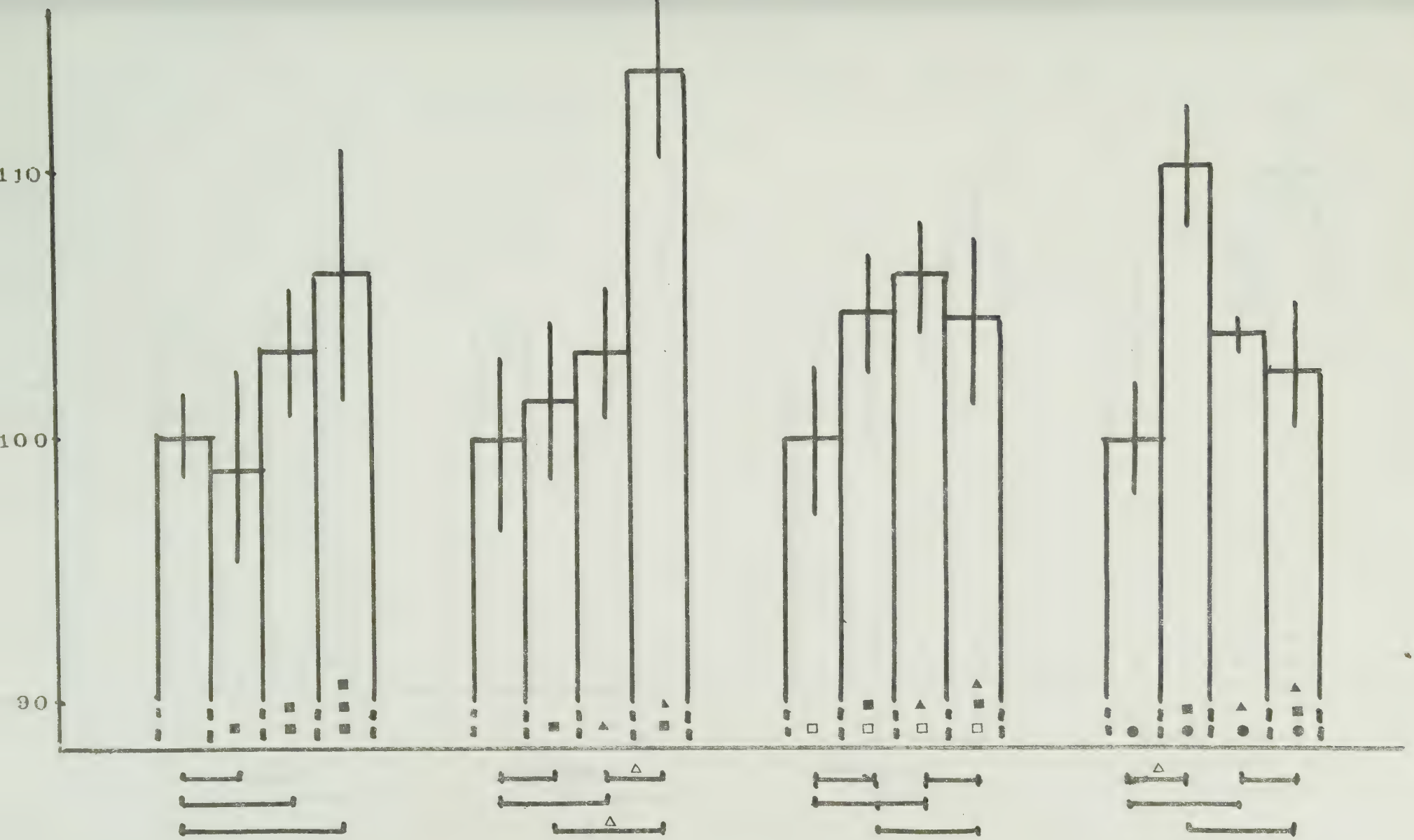


Figure 21 - Pourcentage Dosage/Témoin de captation du ^{14}C D glucose (U) sous l'influence du magnésium (20 mEq/l) ■ , de la STH (5µg/ml) ▲ , de la théophylline (0,5mg/ml) □ et du méthyl 2 imidazole (10mg/ml) ● , pour le diaphragme isolé de rat hypophysectomisé. △ $P < 0,05$

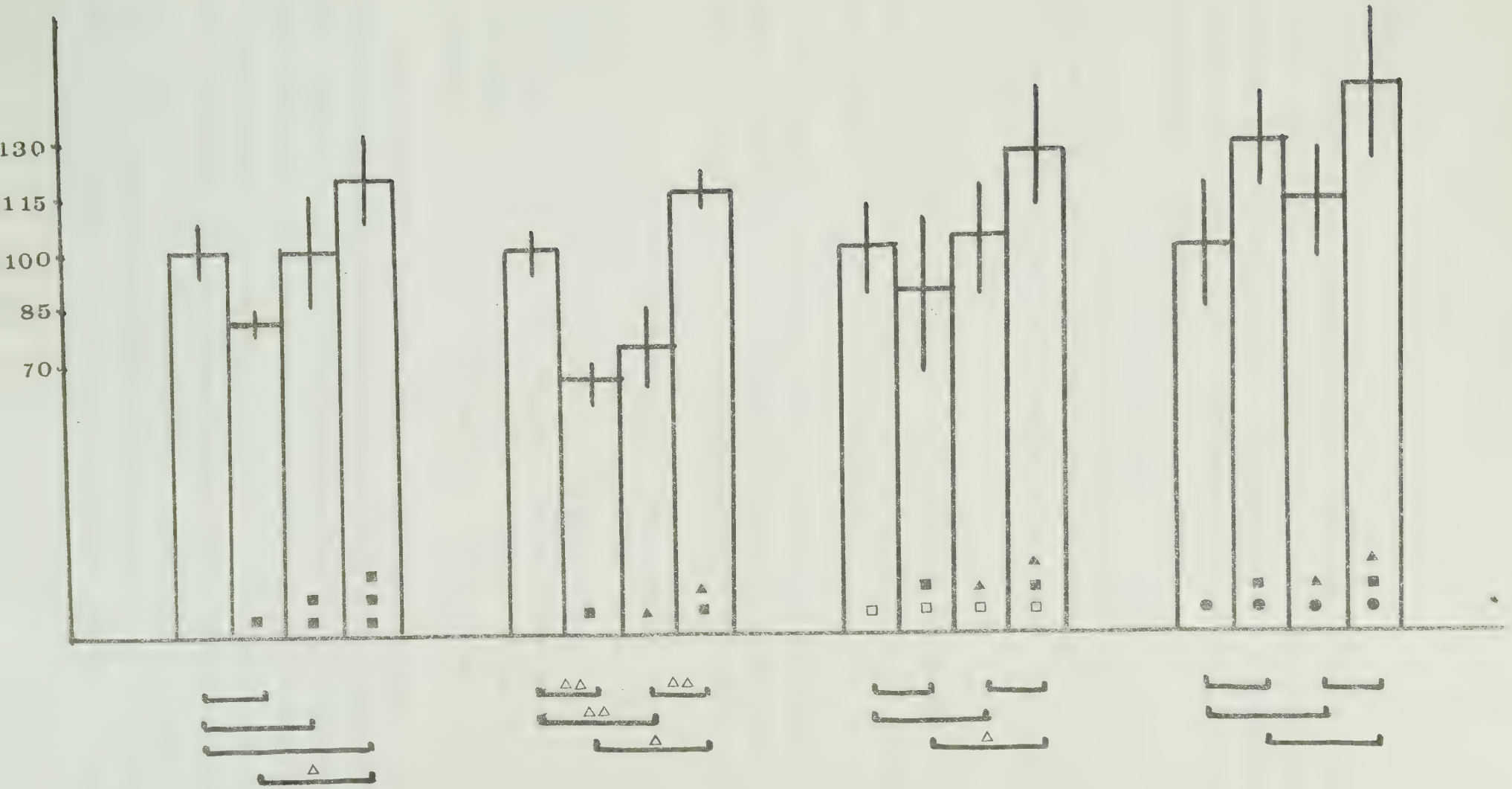


Figure 22 - Pourcentage Dosage/Témoin de formation d'AMPc à partir d'adénine $^{3}H_2$ sous l'influence du magnésium (20 mEq/l) ■ , de la STH (5µg/ml) ▲ , de la théophylline (0,5mg/ml) □ et du méthyl 2 imidazole (10mg/ml) ● , par le diaphragme isolé de rat hypophysectomisé (6 essais par expérience) △ $P < 0,05$ △ △ $P < 0,05$

Discussion

Le fait essentiel résultant de ces essais porte surtout sur les différences entre le D glucose et le D xylose. Pour la captation de ce dernier sucre le magnésium n'a apparemment aucune influence sur l'action de la STH seule ou associée à la théophylline ou au méthyl 2 imidazole.

Alors que l'hormone somatotrope n'augmente la captation du D glucose qu'en présence de magnésium, les associations STH-théophylline ou STH-M2I n'ont pas d'action ni en présence ni en absence de l'ion.

La STH, cependant, garde la potentialité d'augmenter la formation de l'AMPc qu'elle soit associée ou non avec la théophylline, mais seulement en présence de magnésium.

Le parallélisme AMPc formé / captation du D glucose ou du D xylose trouvé en milieu normal (contenant 2,5 mEq/l de magnésium) n'est pas retrouvé en absence ou en présence de 20 mEq/l de l'ion.

La STH en absence de magnésium est inactive sur la captation des sucres et inhibe de manière significative la formation de l'AMPc. L'adjonction de l'ion rend à la STH tant sa capacité de faire capter plus de glucose que de faire former plus d'AMPc par les diaphragmes. L'action du magnésium en milieu STH est très nette. Le magnésium semble donc nécessaire à l'action de la STH.

En présence de théophylline, la STH est inactive, le magnésium n'apporte aucune différence sur la captation du D glucose alors que l'ion redonne à la STH la faculté d'activer l'adénylcyclase. Si au chapitre III nous avons déjà remarqué que la théophylline ne potentialise pas beaucoup la STH (en une demi-heure, elle l'inhibe même légèrement), nous n'avons jamais vu la méthylxanthine rendre totalement inactive l'hormone. Or l'absence ou au contraire un excès de magnésium en présence de théophylline rend l'hormone incapable de provoquer une captation accrue de glucose. Ce résultat

assez inattendu nous a conduitsà renouveler l'essai comme le montre le nombre de diaphragmes testés. Au chapitre IV nous avons vu que l'association théophylline + STH tendait à faire disparaître le glycogène de la cellule. Le magnésium participe en tant que co-facteur de la glucopyranose 1-6 phospho mutase à la transformation réversible du glucose 1 phosphate en glucose 6 phosphate. L'ion et la théophylline pourraient s'opposer à deux niveaux : au niveau de la phosphodiestérase inhibée par la méthylxanthine, activée par l'ion (RASMUSSEN et TENENHOUSE, 1968) et au niveau de la glycogénolyse. Ainsi en présence de théophylline la STH serait inactive: l'absence de magnésium l'empêchant d'activer l'adénylcyclase. L'antagonisme entre la théophylline et le magnésium rend l'hormone inactive sur la captation du D glucose même si l'AMPc est augmenté.

Les phénomènes ne sont pas nets pour le D xylose, mais pour d'autres raisons. Dans l'association STH + magnésium, l'ion permet l'action de la STH tout en inhibant directement la captation; il en résulte l'absence de tout effet visible.

Nous retrouvons le rôle potentialisant de la théophylline sur l'hormone, phénomène déjà vu amplement durant la première partie. Le magnésium n'influence que peu cette action, la captation du D xylose ne semblant pas être influencée par le métabolisme interne de la cellule comme c'est le cas pour le D glucose.

Avec le méthyl 2 imidazole, les conclusions à tirer sont proches de celles obtenues avec la théophylline. Pour la captation du D xylose, le magnésium ne modifie pas les actions du M2I et de la STH; nous retrouvons celles déjà rencontrées en milieu normal.

Pour la formation de l'AMPc et la captation du D glucose, aucun résultat net ne ressort des essais avec le M2I, la STH et le magnésium.

Conclusion

Le magnésium a deux actions différentes sur la captation des sucres. Pour le D xylose il possède un effet inhibiteur propre mais il n'empêche pas les actions de la STH seule ou associée à la théophylline ou au méthyl 2 imidazole. Pour le D glucose, l'ion par lui-même n'a pas d'action, mais est nécessaire à l'action de la STH seule alors qu'il inhibe celle de la STH associée à la théophylline et au M2I.

Si le magnésium déprime la formation de l'AMPc il est par contre nécessaire pour que la STH active l'adénylcyclase musculaire.

COMPARAISON DES ACTIONS DU CALCIUM ET DU MAGNESIUM

Le calcium et le magnésium font partie de la même famille des alcalino-terreux. Ils possèdent en commun de nombreuses propriétés. Il nous a paru intéressant de comparer les résultats obtenus avec ces deux corps.

Sur le tableau XXXVIII sont reportés les résultats de captation des deux sucres et de formation de l'AMPc sous l'influence des deux métaux et la différence qu'il peut exister entre les captations provoquées par ces ions.

Le tableau XXXIX montre les différences de captation qui peuvent exister entre les deux sucres dans les mêmes conditions.

Le calcium inhibe plus la captation du D xylose que ne le fait le magnésium; que les ions soient seuls ou associés à la STH et/ou à la théophylline. Cette inhibition du calcium varie entre 5 et 9 p.100, et pourtant le calcium est à une concentration molaire 4 fois inférieure à celle du magnésium.

Pour les captations du D glucose, les écarts de captation provoqués par les deux alcalino-terreux sont plus grands et varient de -6 à +6 p.100; mais alors que pour le D xylose les ions réduisent les captations, pour le D glucose ils les augmentent légèrement. Nous voyons que les captations du D glucose sont différentes de celles du D xylose et qu'elles sont toujours supérieures.

Suivant les comparaisons, le calcium provoque une captation du D glucose supérieure de 9 à 15 p.100 à celle du D xylose. Avec le magnésium, cette même différence existe et varie entre 3 et 12 p.100.

TABLEAU XXXVIII

Différence d'action du calcium et du magnésium sur les captation du ^{14}C D xylose (U) ou du ^{14}C D glucose (U) et la formation d'AMPc par le diaphragme isolé de rat hypophysectomisé après une heure d'incubation

Composition du milieu d'incubation				Captation du D xylose en pourcentage D/T			Captation du D glucose en pourcentage D/T			AMPc en pourcentage D/T	
Témoin			Dosage	en présence de			en présence de			en présence de	
STH	Théo	M2I	Témoin + ion	Ca^{++}	Mg^{++}	Différence $Ca^{++} - Mg^{++}$	Ca^{++}	Mg^{++}	Différence $Ca^{++} - Mg^{++}$	Ca^{++}	Mg^{++}
-	-	-	"	89,6	95,2	+ 5,6	101,4	100,2	- 1,2	100,6	72,9
+	-	-	"	94,6	100,0	+ 5,4	103,7	107,9	+ 4,2	83,2	159,0
-	+	-	"	85,1	94,2	+ 9,1	100,0	106,3	+ 6,3	48,2	88,9
+	+	-	"	91,4	96,1	+ 5,7	105,3	99,0	- 6,3	178,3	121,8
-	-	+	"	119,0	100,3	- 19	96,3	110,8	+14,5	99,8	127,4
+	-	+	"	109,5	103,0	- 5,5	101,1	98,8	- 2,3	100,0	129,5

Résultats tirés des tableaux XXXI, XXXII, XXXVI et XXXVII

TABLEAU XXXIX

Différence de captation du ^{14}C D glucose (U) et du ^{14}C D xylose (U), provoquée par le calcium ou le magnésium en présence de STH (5µg/ml, théophylline (0,5mg/ml) ou M2I (10mg/ml) par le diaphragme isolé de rat hypophysectomisé après une heure d'incubation

Composition du milieu d'incubation				Action du calcium			Action du magnésium		
Témoin			Dosage	Captation en pourcent.D/T du		Différence entre	Captation en pourcent.D/T du		Différence entre
STH	Théo	M2I	Témoin + ion	D xylose	D glucose	xylos.-gluc.	D xylose	D glucose	xylos.-gluc.
-	-	-	"	89,6	101,4	+ 11,8	95,2	100,2	+ 5
+	-	-	"	94,6	103,7	+ 9,1	100,0	107,9	+ 7,9
-	+	-	"	85,1	100,0	+ 14,9	94,2	106,3	+ 12,1
+	+	-	"	91,4	105,3	+ 14,9	96,1	99,0	+ 2,9
-	-	+	"	119,0	96,3	- 22,7	100,3	110,8	+ 10,5
+	-	+	"	109,5	101,1	- 8,4	103,0	98,8	- 4,2

Résultats tirés des tableaux XXXI, XXXII, XXXVI et XXXVII

Le méthyl 2 imidazole inverse partiellement les résultats : le D xylose est plus capté que le D glucose en présence de calcium. La même action est retrouvée avec le magnésium mais seulement en présence de STH.

Apparemment le D glucose est un mauvais témoin du passage des sucres à travers la membrane. Les transformations ultérieures de ce sucre après son passage transmembranaire peuvent tendre à accélérer la captation et inversement une glycogénolyse peut freiner ce passage, ainsi nous observons souvent des actions moins nettes avec le D glucose qu'avec le D xylose.

Pour la formation d'AMPc, les deux ions se comportent différemment. Alors que le magnésium diminue l'AMPc, il restaure l'activité de la STH seule, le calcium par lui-même n'a pas d'action. En présence de théophylline, seul le calcium restaure l'activité de la STH, le magnésium n'a qu'une activité négligeable. Cette différence est peut-être dûe à un point d'impact différent : le calcium fixerait l'hormone sur l'unité régulatrice de l'adénylcyclase mais activerait aussi la phosphodiestérase. Le magnésium serait nécessaire à l'activité de l'unité catalytique de l'adénylcyclase qui transforme l'ATP en AMPc.

En conclusion, tant pour les captations que pour la formation de l'AMPc le calcium et le magnésium se comportent différemment. Le calcium déprime la captation du D xylose, le magnésium est sans action. Le calcium a peu d'effet sur l'AMPc tant que la phosphodiestérase n'est pas inhibée. Le magnésium restaure seul l'activité de la STH sur l'adénylcyclase.

C H A P I T R E XV

ACTIONS DU POTASSIUM

Le potassium est un ion très abondant dans le milieu intracellulaire. On le retrouve aussi à un taux beaucoup plus faible dans le milieu extracellulaire (soit l'inverse du calcium).

Les rapports de cet ion avec la formation ou l'action métabolique de l'AMPc ont fait l'objet de nombreuses études et les auteurs sont d'accord pour trouver une relation entre la présence de cet ion et l'AMPc. Le potassium provoque souvent les mêmes actions que le nucléotide mais nous pourrons cependant remarquer quelques différences.

NAMM et coll. (1968) sur le coeur dépolarisé par un excès de potassium observent une petite et transitoire augmentation de l'AMPc après action de l'adrénaline : ils suggèrent que l'excès de potassium interfère avec l'action de l'adrénaline sur l'adénylcyclase. Mais LUNDHOLM et coll. (1967) ont remarqué que le potassium à forte dose (145mEq/l) augmente de 9 fois la teneur en AMPc du diaphragme de rat et potentialise l'effet de l'adrénaline sur l'accumulation du nucléotide. Pour ALLEN et Mac LAREN (1970) le potassium est nécessaire pour que l'adrénaline, à faible dose, puisse avoir une action lipolytique.

HERMIER et JUTISZ (1969) constatent que le potassium à la dose de 60 mEq/l stimule la synthèse de la progestérone comme la L.H. Les effets de la LH et de l'ion sont additifs. De même pour BARTOVA et BIRMINGHAM (1971) le potassium, utilisé à la même dose que HERMIER, provoque une augmentation de la production des stéroïdes par les corticosurrénales en absence d'ACTH mais les effets de cette hormone et de l'ion ne sont pas additifs (120mEq/l de potassium réduisent même l'action de l'ACTH).

GOULD et CHAUDRY (1970a-b), WADE et coll. (1970) remarquent que la stimulation de la lipolyse par la théophylline ou le dibutyryl AMPc n'est pas affectée par la présence de potassium mais que l'effet de l'AMPc est augmenté par l'absence de l'ion. Ce dernier résultat est retrouvé par MOSINGER et VAUGHAN (1967 a-b). FAIN (1968) constate, au contraire, que l'absence de potassium inhibe l'action lipolytique de la théophylline.

GOULD et CHAUDRY (1970 a-b) sur le muscle soléaire de chat, LETARTE et coll. (1969 b-c) sur les cellules adipeuses de souris, BIHLER (1968) sur le coeur, CLAUSEN (1969), CLAUSEN et TORBEN (1969), BLEICHER et CHOWDHURY (1969) sur les adipocytes de rats montrent que le potassium abaisse la captation du glucose par les tissus étudiés. Les derniers auteurs précisent que cette captation est augmentée par le dibutyryl AMPc.

L'ouabaïne, qui a la propriété de faire sortir le potassium des cellules, provoque les mêmes effets que l'absence de l'ion, c'est-à-dire une augmentation de la captation du glucose. Mais, en présence d'insuline, le potassium ou l'ouabaïne perdent leur activité. (LE TARTE et coll., 1969 - CLAUSEN, 1969 - HO et coll., 1967 a-b - KOHN et CLAUSEN, 1971).

Inversement l'AMPc peut avoir des effets sur les mouvements du potassium. RASMUSSEN et coll. (1968) montrent que, chez le rat thyroparathyroïdectomisé, le dibutyryl AMPc et la parathormone entraînent une excrétion urinaire accrue de potassium. Pour FRIED-

MAN et PARK (1968), FRIEDMAN (1972) les catécholamines et le glucagon provoquent un flux de potassium à partir du foie perfusé de rat. Ces résultats prouvent que l'AMPc fait sortir le potassium des cellules.

Nous avons étudié l'influence du potassium à 20 mEq/l (1) sur la captation du D xylose et du D glucose par le diaphragme de rat hypophysectomisé en présence de STH, de théophylline ou de M2I.

Technique

Le D xylose est employé à la dose habituelle de 75mg par litre, le D glucose à la dose de 1g par litre (tous les essais précédents ont été effectués avec une dose moitié de D glucose). Lors des expériences avec le D glucose des appréciations de formation d'AMPc sont réalisées selon la méthode de marquage préalable par l'adénine ^{3}H-2.

Résultats

Les résultats obtenus sont reportés sur les tableaux XL (actions de la STH, du potassium et de la théophylline), XLI (actions de la STH, du potassium et du méthyl 2 imidazole) et sur les figures 23 et 24.

Le potassium réduit la captation tant du D xylose que du D glucose, cette action est très significative à la dose de 60 mEq/l, significative à 20 mEq/l mais pour un nombre d'essais plus grand. A 40 mEq/l le résultat n'est significatif que pour le D xylose.

Que le milieu renferme ou non du potassium, la STH n'a qu'une faible action non significative. En présence de théophylline, l'hormone a une action nette sur la captation des deux sucres,

---

(1) Les doses de potassium utilisées ne sont pas physiologiques mais nous avons tenu à nous rapprocher des travaux antérieurs (les auteurs emploient couramment de 60 à 145mEq/l de potassium) sans cependant nous éloigner par trop des doses physiologiques, ce qui explique l'emploi de cette dose de 20mEq/l.

TABLEAU XL

Action du Potassium (20mEq/l), de la STH (5µg/ml) et la théophylline (0,5mg/ml) sur la captation du ^{14}C D xylose (U) ou du ^{14}C D glucose (U) et l'AMPc formé (dose par la méthode de KUO) par le diaphragme isolé de rat hypophysectomisé

Composition du milieu d'incubation						D xylose capté en pourcentage D/T	D glucose capté en pourcentage D/T	AMPc formé en pourcentage D/T
Témoins			Dosage					
K	STH	Théo	K	STH	Théo			
-	-	-	+	-	-	(18) 92,6 ± 3,2*	(12) 93,4 ± 2,9**	(6) 147,0
-	-	-	-	+	-	((6) 96,9 ± 6,2	(6) 107,0 ± 4,4	(6) 167,7
+	-	-	+	+	-	(6) 106,0 ± 4,2	(6) 109,4 ± 6,4	(6) 148,8
-	+	-	+	+	-	(6) 106,1 ± 5,3	(6) 92,7 ± 3,3	(6) 128,6
-	-	+	+	-	+	(6) 99,7 ± 5,4	(6) 93,1 ± 3,4	(6) 109,0
-	-	+	-	+	+	(6) 92,5 ± 4,9	(6) 105,0 ± 3,2	(6) 95,8
+	-	+	+	+	+	(6) 113,5 ± 2,4*	(6) 117,7 ± 4,0**	(6) 128,2*
-	+	+	+	+	+	(6) 118,3 ± 2,9**	(6) 104,5 ± 4,6	(6) 145,8*
-	-	-	20 mEq/l	-	-	(6) 85,3 ± 6,2	(6) 95,5 ± 3,4	
-	-	-	40 mEq/l	-	-	(6) 87,3 ± 5,8*	(6) 92,1 ± 4,8	
-	-	-	60 mEq/l	-	-	(6) 80,0 ± 4,3**	(6) 83,9 ± 5,5**	

( ) Nombre d'essais * $P < 0,05$ ** $P < 0,01$

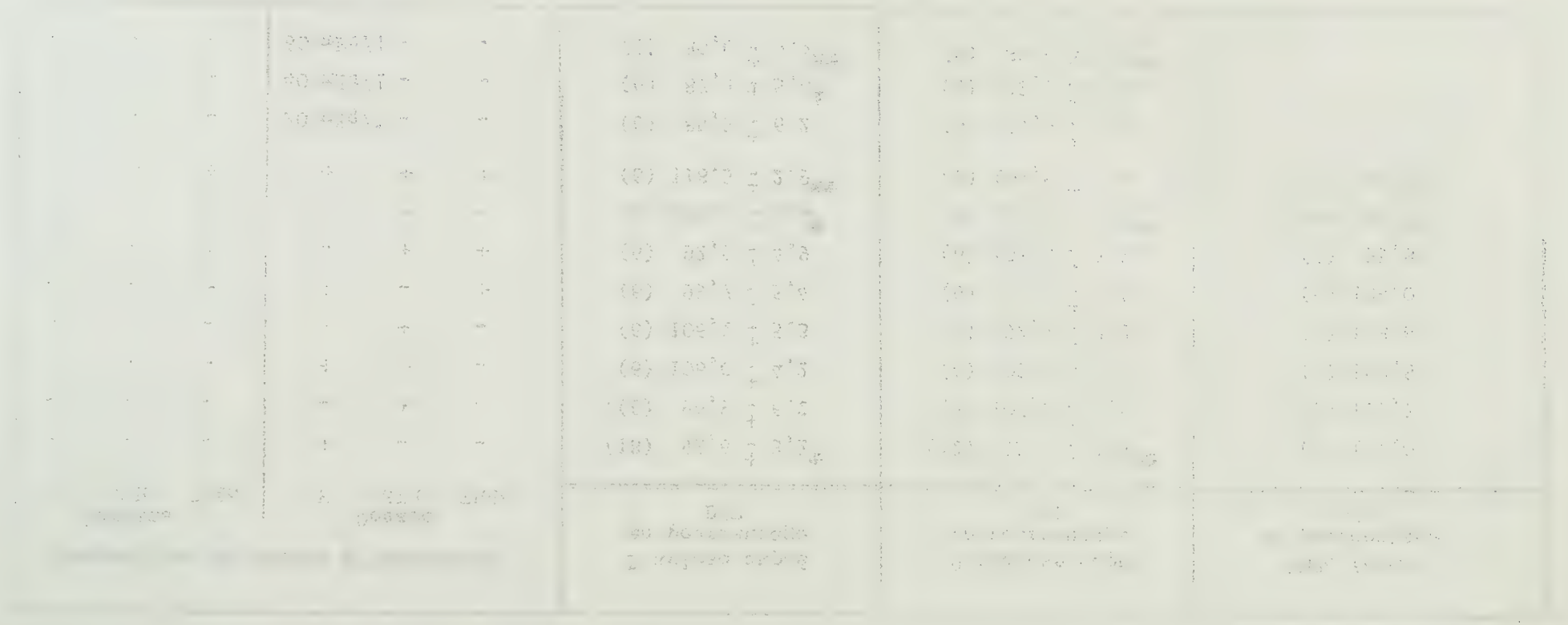


TABLEAU XLI

Action du Potassium (20mEq/l), de la STH (5µg/ml) et du méthyl 2 imidazole (10mg/ml) sur la captation du ^{14}C D xylose (U) ou du ^{14}C D glucose (U) et la formation de l'AMPc (dose selon la méthode de KUO) par le diaphragme isolé de rat hypophysectomisé

Composition du milieu d'incubation						D xylose capté en pourcentage D/T	D glucose capté en pourcentage D/T	AMPc formé en pourcentage D/T
Témoins			Dosage					
K	STH	M2I	K	STH	M2I			
-	-	-	-	-	+	(6) 113,3 ± 4,7*	(6) 122,9 ± 4,2**	(6) 26,3**
+	-	-	+	-	+	(6) 117,8 ± 1,6**	(5) 119,2 ± 8,8**	(5) 15,9**
-	-	+	+	-	+	(6) 98,8 ± 3,5	(11) 93,7 ± 3,3*	(11) 64,7
-	-	+	-	+	+	(6) 91,9 ± 4,9	(5) 93,6 ± 1,5	(6) 132,8
+	-	+	+	+	+	(6) 102,6 ± 2,6	(6) 111,6 ± 6,3	(6) 223,5**
-	+	+	+	+	+	(6) 108,4 ± 2,2*	(6) 105,4 ± 3,4	(6) 163,7

( ) Nombre d'essais * $P < 0,05$ ** $P < 0,01$

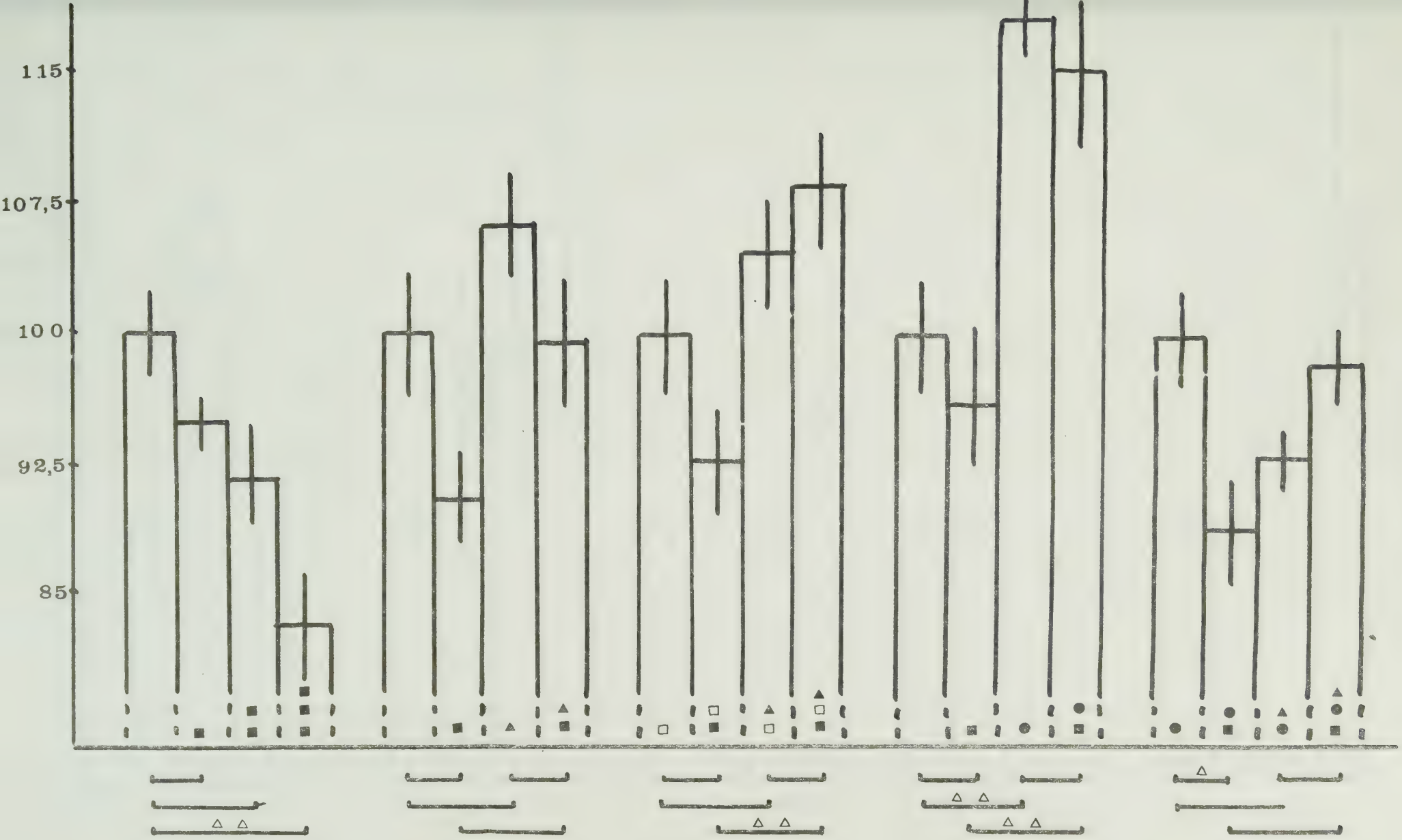


Figure 23 - Pourcentage Dosage/Témoin de captation du ^{14}C D glucose (U) sous l'influence du potassium (20 mEq/l) ■ , de la STH (5µg/ml) ▲ , de la théophylline (0,5mg/ml) □ et du méthyl 2 imidazole (10mg/ml) ● (incubation d'une heure, 6 essais par expérience)

△ P < 0,005 △ △ P < 0,001

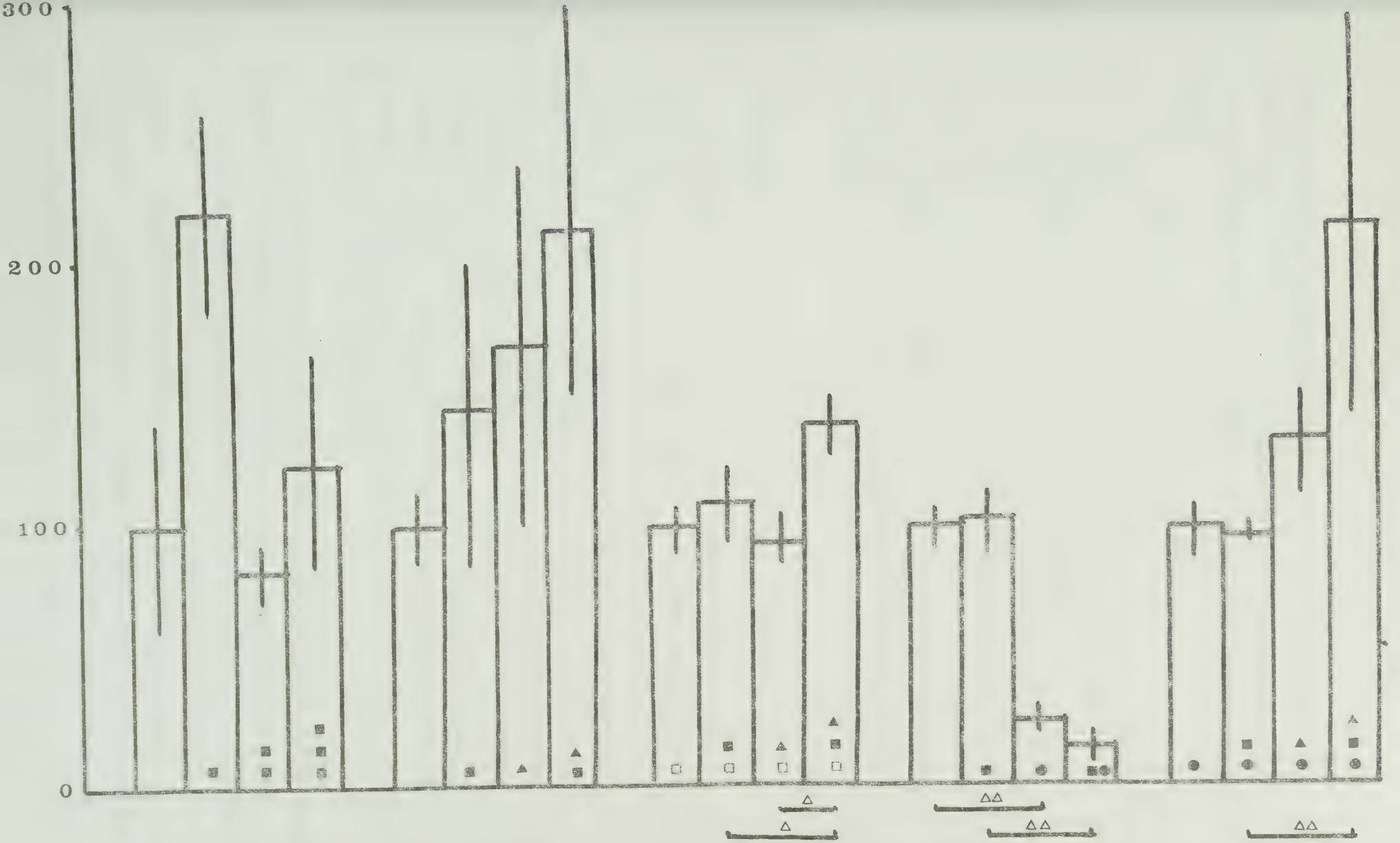


Figure 24 - Pourcentage dosage/Témoin de formation d'AMPc à partir d'adénine $^{3}H2$ sous l'influence du potassium (20mEq/l) ■ , de la STH (5µg/ml) ▲ , de la théophylline (0,5mg/ml) □ et du méthyl 2 imidazole (10mg/ml) ● (incubation d'une heure, 6 essais par expérience)

△ $P < 0,05$ △△ $P < 0,01$

mais seulement en présence de potassium. L'ion entraîne une augmentation significative de la captation du D xylose par l'association théophylline et STH, soit l'action inverse de celle de l'ion seul.

La formation de l'AMPc est appréciée parallèlement aux mesures de la captation du D glucose, selon la méthode du marquage préalable à l'adénine. Le potassium à 20mEq/l augmente l'AMPc. La STH, en présence ou en absence de l'ion, fait, elle aussi, monter le taux de l'AMPc dans les diaphragmes mais les différences ne sont pas significatives. Les résultats deviennent intéressants en présence de théophylline où tant la STH en présence de potassium que le potassium en présence de STH augmentent significativement l'AMPc. De même, en présence de M2I et de potassium la STH accroît de manière très significative la formation du nucléotide cyclique.

Discussion

Le potassium agit-il sur l'adénylcyclase ou sur la phosphodiestérase ? Que l'ion seul augmente l'AMPc ne peut permettre de conclure. En présence de théophylline il n'a plus d'action sur l'AMPc. Son action pourrait avoir lieu au niveau de la phosphodiestérase, cette enzyme étant inhibée par la théophylline, l'ion n'aurait plus qu'une faible action. Une inhibition de la phosphodiestérase pourrait expliquer le fait que l'association STH-théophylline n'est active qu'en la présence de l'ion. L'inhibition de l'enzyme serait plus grande par le potassium et la théophylline réunis que par chacun de ces corps isolé, l'action de la STH serait ainsi extériorisée.

Les résultats de captation des sucres et de la formation de l'AMPc nous mènent à un paradoxe : le potassium augmente la formation de l'AMPc, nous retrouvons les résultats de LUNDHOLM, et déprime la captation du D glucose comme l'avaient déjà observé LETARTE, TORBEN, HO..., et la STH augmente la formation de l'AMPc et accroît la captation des sucres. Donc, suivant l'excitation provoquant sa formation l'AMPc pourrait-il avoir deux effets opposés ? Induit par la STH ou la STH+théophylline, il serait

"hypercapteur" et par le potassium "anticapteur". Ce paradoxe est encore confirmé par le méthyl 2 imidazole qui, comme nous le voyons sur le tableau XLI ,diminue très fortement l'AMPc et accroît pourtant la captation des sucres.

Cependant, le seul AMPc n'est sûrement pas le responsable unique dans la cellule des mouvements des sucres, les corps induisant sa formation peuvant agir sur d'autres mécanismes, qui sont, eux inhibiteurs de la captation. L'insuline agit en faisant entrer à la fois le potassium et les sucres dans la cellule. Après avoir induit une augmentation de l'AMPc,comme il ressort des travaux de FRIEDMAN, le potassium peut être expulsé de la cellule par le nucléotide.Il pourrait y avoir une sorte de régulation, l'ion augmenterait le nucléotide qui à son tour ferait sortir l'ion.

L'entrée du sucre peut être ralentie par ces mouvements de l'ion ainsi qu'éventuellement par une glycogénolyse dûe à l'AMPc.

Conclusion

Le potassium inhibe la captation des sucres mais augmente l'AMPc. L'ion est nécessaire pour que l'association STH+théophylline provoque ses actions habituelles sur la formation d'AMPc et sur la captation des sucres.

D I S C U S S I O N

et

C O N C L U S I O N S G E N E R A L E S

L'étude des actions de la STH sur la captation des sucres par le diaphragme isolé de rat hypophysectomisé nous a permis d'observer les points suivants :

- durant la phase "A" "insulin like", la STH provoque une augmentation simultanée de l'AMPc et de la captation de deux sucres, le D xylose et le D glucose. La théophylline potentialise les effets de la STH.

L'hormone, l'AMPc et le dibutyryl AMPc augmentent la captation des sucres par le diaphragme mais ces composés n'ont pas la même action sur l'incorporation dans le glycogène du D glucose capté : la STH augmente cette incorporation, le dibutyryl AMPc la diminue, l'AMPc est peu actif.

Toujours en temps court, la STH augmente la transformation du glucose en CO_2 et en acide lactique. La théophylline ne potentialise que peu ces actions.

- durant la phase "B" "diabétogène" de la STH, l'hormone n'a plus d'action sur la formation de l'AMPc. L'hormone et les nucléotides perdent leur pouvoir de provoquer une captation accrue des sucres. Les inhibiteurs de synthèse protéique ne leur restaurent pas cette capacité.

Comme la STH, l'insuline en temps bref augmente l'AMPc dans les cellules de diaphragme de rat hypophysectomisé, mais alors que la STH perd son action dans le temps sur la captation des sucres, l'insuline la garde.

A côté de leurs actions propres tant sur l'AMPc que sur la captation des sucres, le calcium, le magnésium et le potassium sont nécessaires pour que la STH présente ses effets en temps court. Cette potentialisation est surtout nette lorsque la phosphodiestérase est inhibée par la théophylline.

Les actions que nous avons étudiées ayant été expérimentées "in vitro", certaines hypothèses sur l'action de la STH peuvent être exclues, par exemple :

- en temps bref (Phase A), l'augmentation de la captation des sucres par les cellules ne fait pas suite à une libération d'insuline par les îlôts du pancréas (YOUNG,1968).

- en temps long (Phase B), la seconde action de la STH qui tend à l'annulation des effets de la phase A n'est pas la conséquence d'une freination de la formation d'insuline ou de son inactivation par un anticorps. Elle ne peut davantage découler d'une mobilisation des acides gras libres, avec captation de ceux-ci préférentiellement au glucose par la cellule (RANDLE,1964).

Du fait que la STH augmente l'AMPc en temps court par le diaphragme de rat hypophysectomisé, quelles conclusions pouvons-nous tirer de l'action de la STH sur la fixation des sucres dont nous rappellons brièvement le mécanisme ?

La fixation des sucres,et plus particulièrement celle du glucose par les cellules, se fait en deux étapes :

- un transfert à travers la membrane cellulaire qui s'effectue le plus souvent à l'aide d'un transporteur,

- puis une phosphorylation catalysée par l'hexokinase avec formation de glucose 6 phosphate. Ce composé,pouvant aussi provenir de la dépolymérisation du glycogène par action de l'AMPc, est un inhibiteur de l'hexokinase.

La STH en temps court active l'adénylcyclase des cellules du diaphragme de rat hypophysectomisé et augmente la fraction "libre" du glucose. Tant par action du nucléotide sur le glycogène, que par augmentation de la captation du sucre, la STH augmente le G6P et freine ainsi l'hexokinase.

La STH a une première action rapide, décelable en 30 minutes, sur la captation des sucres et la formation de l'AMPc. Ce même AMPc étant capable d'augmenter la captation des sucres par le muscle d'animal hypophysectomisé, nous pouvons émettre l'hypothèse que l'action initiale de la STH sur la captation des sucres est secondaire à une augmentation de l'AMPc.

L'inhibition progressive de la phosphorylation dûe à l'accumulation du G6P tend à freinerle passage du sucre à travers la membrane : c'est ce que l'on observe pendant la phase B de l'action de la STH.

Le rôle des inhibiteurs de synthèse protéique n'est pas clair. Par activation de la phosphodiestérase, ils peuvent empêcher l'augmentation de l'AMPc et réduire ainsi l'accumulation de G6P. L'hexokinase n'étant pas inhibée, la phase initiale de la STH peut se prolonger un certain temps.

Bien que des résultats semblables aient été obtenus avec la STH et avec l'insuline, vis à vis de la formation d'AMPc et de la captation des sucres, en temps courts, leur mode d'action est différent. La relative inactivité de l'insuline à faible dose dans le diabète s'explique par une diminution de la vitesse de phosphorylation et non par un défaut de transport des sucres, soit l'inverse des phénomènes observés lors de l'hypophysectomie.

Sur les tissus d'animaux hypophysectomisés, l'insuline peut restaurer la capacité de transport des sucres par l'intermédiaire de l'AMPc. L'hormone pancréatique est plus active sur les cellules

d'animaux hypophysectomisés que sur celles d'animaux normaux et la vitesse de phosphorylation plus élevée dans les premières que dans les secondes peut expliquer cette différence.

L'insuline garde son activité dans le temps contrairement à la STH, cette persistance d'action serait dûe à la brièveté de l'action de l'insuline sur l'adénylcyclase; en temps long, elle abaisse l'AMPc : le G6P au lieu de s'accumuler se transforme en glycogène, la vitesse de phosphorylation n'est pas inhibée dans le temps.

Le parallélisme entre l'augmentation intracellulaire d'AMPc et l'augmentation de la captation des sucres est généralement vérifié en temps court, mais cependant certaines contradictions peuvent être notées. Le potassium augmente l'AMPc et réduit la captation des sucres la STH en absence de magnésium abaisse l'AMPc sans modifier la captation, la contradiction la plus importante est dûe au méthyl 2 imidazole qui réduit de façon très importante l'AMPc tout en augmentant la captation des sucres. Un milieu de composition ionique équilibré est généralement nécessaire pour observer le parallélisme entre l'augmentation de la captation des sucres et l'augmentation de l'AMPc et pour que la STH ait ses effets maximaux sur ces deux paramètres en temps court.

Par conséquent, l'action initiale d'hypercaptation des sucres par les cellules de muscles d'animal hypophysectomisé sous l'influence de la STH est dûe à une augmentation transitoire du taux d'AMPc dans ces cellules. La disparition à long terme des actions de la STH correspond à l'arrêt de la formation de l'AMPc mais ces deux phénomènes n'ont peut-être pas de relation entre eux.

Nous avons conscience de n'avoir apporté que peu d'éclaircissements sur le mécanisme d'action de la STH.

Nous espérons, toutefois, approfondir certains problèmes soulevés durant cette étude et surtout pouvoir étudier l'action de la STH et de l'insuline <u>in vivo</u> sur l'animal entier, hypophysectomisé ou dépancréaté.

B I B L I O G R A P H I E

ADAMSON, L.F.

Stimulation by N^6O^2dibutyryl adenosine 3'5' cyclic phosphate of amino-acid transport, protein synthesis and chondroitin sulfate synthesis in embryonic bone *in vitro* contrasted with the effects of thyroid hormones.

(1970) Biochim.Biophys.Acta,201,446-452

AHREN,K., HJALMARSON,A.

Early and late effects of growth hormone on transport of aminoacids and monosaccharides in the isolated rat diaphragm.

(1968) Excerpta Medica Foundation,143-152

AKERBLOM,H.K., MARTIN,J.M., GARAY,G.L.

In vitro metabolism of glucose in the isolated fat cells of rats inoculated with a growth hormone secreting tumor (MtT W15). The early effects of hypersomatotropism.

(1971) Hormones and Metabolism Researches,3,326-331

ALLEN,D.O., Mac LAREN,P.J.

Effect of potassium ion, theophylline and propranolol on the biphasic lipolytic response to some catecholamines.

(1970) Biochem.Pharmacol.,19,2569-2579

ALTSZULER,D.,RATHGEB, STEELE,R.

Mechanisms responsible for the hyperglycemia produced by the dibutyryl derivative of cyclic 3'5' adenosine monophosphate.

(1971),Biochem.Pharmcol.,20,2813-2819

APPLEMAN,M.M.,KEMP,R.G.

Puromycin : A potent metabolic effect independent of protein synthesis

(1966) Biochem.Biophys.Res.Commun.,24,564-568

ARGY,W.P.,HANDLER,J.S., ORLOFF,J.

Ca^{++} and Mg^{++} effect on toad bladder response to cyclic AMP, theophylline and ADH.

(1967) Amer.J.Phys.,213,803-808

ARVILL,A., HJALMARSON,A.

Effects of growth hormone on the metabolism of the isolated levator ani muscle of the rat.

(1967) Acta Endocrinol.,56,15-25

ARVILL,A., AHREN,K.

Effects of insulin on the intact levator ani muscle of the rat. I-Effects on the accumulation of α AIB et D xylose.

(1967) Acta Endocrinol.,56,279-288

ASSAN,R.

Le système de l'adénylcyclase dans la distribution de l'énergie.

(1970) Path.Biol.,18,489-497

ASSAN,R., PIGNARD,P., ROSSELIN,G., TCHOBROUTSKY,G.

Le glucagon. Données physiologiques récentes.

(1968) Path.Biol.,16,979-1002

BAR,H.P., HECHTER,O.

Adenyl-cyclase and hormone action. III- Calcium requirement for ACTH stimulation of adenyl-cyclase.

(1969) Biochem.Biophys.Research Commun,35,681-686

BARTOVA,A., BIRMINGHAM,M.K.

Stimulation in vitro of lactic acid production by Rodent adrenal glands. Effects of glucose, ACTH,3'5' cyclic AMP, ouabain, potassium, anaerobiosis and corticosterone.

(1971) Endocrinol.,88,845-856

BATTAGLIA,F.C., RANDLE,P.J.

Regulation of glucose uptake by muscle. IV- The specificity of monosaccharide transport systems in rat diaphragm muscle.

(1960),Biochem.J.,75,408-416

BEVIZ,A., LUNDHOLM,L., MOHME-LUNDHOLM,E.

Cyclic AMP as a mediator of hormonal metabolic effects in brown adipose tissue.

(1971) Acta.Physiol.,Scand., 81,145-156

BHATTACHARYA,G.

Effects of metal ions on the utilization of glucose on the influence of insulin on it by the isolated rat diaphragme.

(1961) Biochem.J.,79,369-377

BIHLER,I.

The action of cardiotonic steroids on sugar transport in muscle in vitro.

(1968)Biochim.Biophys.Acta.,163,401-410

BIRGE,C.A., PEAKE,G.T., MARIZ,I.K., DAUGHADAY,W.H.

Radioimmunoassayable growth hormone in the rat pituitary gland : effects of age, sex and hormonal state.

(1967) Endocrinol.,81,195-204

BLECHER,M., MERLINO,N.S., RO'ANE,J.T.

Control of the metabolism and lipolytic effects of cyclic 3'5'-adenosine monophosphate in adipose tissue by insulin, methylxanthines and nicotinic acid.

(1968) J.Biol.Chem.,243,3973-3977

BLEICHER,S.J., CHOWDHURY,F.R.

Effects of 3'5'-cyclic adenosine monophosphate, free fatty acids, and cations on glucose metabolism in rat epididymal fat tissue.

(1969) Diabetes, 18,supp^{t}1,347

BOLODIA,G., YOUNG,F.G.

Growth hormone and carbohydrates metabolism in vitro.

(1967) Nature, 215,960-961

BRADHAM,L.S., WOOLLEY,D.W.

A chemical method for the quantitative determination of A 3'5'-MP.

(1964) Biochim.Biophys.Acta,93,475

BRADHAM,L.S., HOLT,D.A., SIMS,M.

The effect of Ca^{++} on the adenyl cyclase of calf brain.

(1970) Biochim.Biophys.Acta,201,250-260

BRAY,G.A.

A simple efficient liquid scintillator for countingaqueous solutions in a liquid scintillation counter.

(1960) Analytical biochemistry,Vol.1,279-285

BRECKENRIDGE,B.McL.

The measurement of cyclic adenylate in tissue.

(1964), Proc.Natl.Acad.Sci.,52,1580-1586

BRON,T., ROUS,S.

Effets du 3'5'-GMP cyclique et du 3'5'-AMPc sur le métabolisme glucolipidique *in vivo*.

(1970) Experientia,26,685-691

BRON,Th., ROUS,S.

Comparaison de quelques effets du 3'5'GMP cyclique et du 3'5' AMP cyclique sur le métabolisme glucolipidique de la souris vivante.

(1971) Biochim.Biophys.Acta,237,156-164

BRONK,M.S., FISHER,R.B.

The interaction of growth hormone and insulin in the perfused rat heart.

(1957) J.Physiol.,136,435-448

BROOKER,G.

Determination of picomoles amounts of enzymatically formed adenosine 3'5'cyclic monophosphate by high pressure anion exchange chromatography

(1970) Anal.Chem.,42,1108-1110

BROOKER,G., THOMAS,L.J., APPLEMAN,M.M.

The assay of adenosine 3'5'cyclic monophosphate and guanosine 3'5' cyclic monophosphate in biological materials by enzymatic radio-isotopic displacement.

(1968) Biochem.,7,4177-4182

BROWN,D.H., PARK,C.R., DAUGHADAY,W.H., CORNBLATH,M.

The influence of preliminary soaking on glucose utilization by diaphragm.

(1952) J.Biol.Chem.,197,167-174

BULBROOK,R.D., OTTAWAY,J.H.

Effects of pituitary growth hormone on glucose utilization by muscle.

(1954) J.Physiol.,123,57 P-58 P

BUTCHER,R.W.

Cyclic 3'5'AMP and the lipolytic effects of hormones on adipose tissue.

(1966) Pharmacol.Rev.,18,237-241

BUTCHER,F.R.

A rapid filter paper-disk assay for micomole amount of cyclic AMP using a cyclic AMP dependent protein kinase.

(1971) Horm.Metab.Res.,3,336-340

BUTCHER,R.W., SUTHERLAND,E.W.

Adenosine 3'5'-phosphate in biological materials. I- Purification and properties of cyclic 3'5'characterize adenosine 3'5'-phosphate in human urine.

(1962) J.Biol.Chem.,237,1244-1250

BUTCHER,R.W., SNEYD J.G.T., PARK,C.R., SUTHERLAND,E.W.

Effect of insulin on adenosine 3'5'monophosphate in the rat epididymal fat pad.

(1966) J.Biol.Chem., 241,1651-1653

BUTCHER,R.W., BAIRD,C.E., SUTHERLAND,E.W.

Effects of lipolytic and antilipolytic substances on adenosine 3'5'-monophosphate levels in isolated fat cells.

(1968) J.Biol.Chem.,243,1705-1712

BUTCHER,F.R., SCOTT,D.F., POTTER,W.R.

Concurrent measurement of adenosine 3'5'monophosphate, tyrosine, aminotransferase and a amino isobutyrate uptake in rat liver after injection of glucagon.

(1971) FEBS Letters,13,114-116

CAHILL,G.F.

Physiology of insulin in man.

(1971) Diabetes,20,785-799

CAMPBELL,J., RASTOGI,K.S.

Effects of growth hormone on the rate of disappearance of insulin from blood in depancreatized and Houssay dog.

(1967) Metabolism,19,562-571

CASTAGNA,M.

A microdetermination of cyclic AMP based upon activation of a liver protein kinase.

(1970) FEBS Letters,8,289-292

CEHOVIC G., LEWIS,U.J., VANDER LAAN,W.P.

Etude de l'action de l'acide adénosine 3'5'monophosphate cyclique sur la libération de l'hormone de croissance et de la prolactine in vitro.

(1970a),C.R.Ac.Sci.Série D,270,3119-3122

CEHOVIC,G., MARCUS,I., GABBAI,A., POSTERNAK,T.

Etude de l'action de certains nouveaux analogues de l'AMP cyclique sur la libération de l'hormone de croissance et de la prolactine in vitro.

(1970b) C.R.Ac.Aci.,Série D,271,1399-1402

CHAMBAUT,A.M., EBOUE-BONIS,D., HANOUNE,J.

Antagonistic actions between dibutyryl adenosine 3'5'-MP cyclic and insulin on the metabolism of the surviving rat diaphragm.

(1969) Biochem.Biophys.Res.Comm.,34,283-290

CLAUSEN,T.

The relationship between the transport of glucose and cations across cell membranes in isolated tissues. V- Stimulating effect of ouabain K^+ free medium and insulin on efflux of3-O methylglucose from epididymal adipose tissue.

(1969) Biochim.Biophys.Acta,183,625-634

CLAUSEN,T.

The relationship between the transport of glucose and cations across E membranes in isolated tissues. III- Effects of Na^+ and hyper osmolarity on glucose metabolism and insulin responsiveness in isolated rat diaphragm.

(1968) Biochim.Biophys.Acta,150,56-65

COUNIS,R.

Activité adénylcyclase au cours du développement du tissu adipeux.

(1971) D.E.A. de Biochimie, service de lipophysiologie du C.N.R.S.

DAUGHADAY,W.H., KIPNIS,D.M.

The growth promoting and antiinsulin actions of somatotropin.

(1966) Recent Progress in Hormone Research,22,49-99

DAVOREN,P.R., SUTHERLAND,E.W.

The cellular location of adenylcyclase in the pigeon erythrocyte.

(1963) J.Biol.Chem.,238,3016-3023

DAWSON,K.G., BECK,J.C.

Early and late effects of growth hormone on the rat diaphragm.

(1968) Proc.Soc.Exp.Biol.Med.,127,617-620

DICKERMAN,E., DICKERMAN,S., MEITES,J.

Influence of age, sex, and estrous cycle on pituitary and plasma GH levels in rats.

(1972) in Growth and Growth hormone, Exc.Medica,Amsterdam,pp.252-260

DOMINGUEZ,J.M., GREENBERG,E., PAZIANOS,A.G., RAY,B.S., PEARSON,O.H.

Diabetogenic and hypoglycemic effects of HGH.

(1960) Act.Endocrin.Danem.,35,248-257

DRURY,D.R., WICK,A.N., SHERRIL, J.W.

The effect of hyperglycemic factor on the metabolism of glucose by the extra hepatic tissues.

(1954) Diabetes,3,129-132

EASTMAN,R.C., GOODMAN,H.M.

Insensitivity of adipocytes of hypophysectomized rats to growth hormone and insulin.

(1971) Proc.Soc.Exp.Biol.Med.,137,168-174

EBADI,M.S., WEISS,B., COSTA.E.

Microassay of adenosine 3'5'monophosphate (cyclic AMP) in brain and other tissues by the luciferin luciferase system.

(1971) J.Neurochem.,18,183-192

EBOUE-BONIS,D., CHAMBAUT,A.M., VOLFIN,P., CLAUSER,H.

Action sélective de la N éthylmale-imide sur la stimulation par l'insuline du métabolisme du diaphragme en survie.

(1967) Bull.Soc.Chim.Biol.,49,415-431

EDELMAN,P.M., EDELMAN, I.C.

Insulin-like effects of adenosine 3'5'-monophosphate on rat striated muscle.

(1966) Nature,210,1017-1019

EICHORN,J., HECHTER,O

Insulin induced accumulation of D xylose against an apparent concentration gradient in diaphragm muscle in vivo.

(1961) J.Gen.Physiol.,45,15-22

ELRICK,H., HLAD,C.J., WITTEN,T.

The enhancement of peripheral glucose utilization by glucagon.

(1955) J.Clin.Invest.,34,1830-1838

ELSAIR,J.

Etude des acides gras libres du plasma dans le nanisme hypothalamo-hypophysaire non traité et traité par l'hormone de croissance.

(1963) Rev.Franç.Etud.Clin.Biol.,8,1000-1008

ELSAIR,J.

Actions de l'hormone de croissance sur le métabolisme des glucides.

(1970) J.Physiol.(Paris),62,123-145

ELSAIR,J., ROYER,P.

Effets de l'hormone de croissance humaine sur différentes épreuves d'exploration fonctionnelle du métabolisme glucidique chez des nains hypophysaires.

(1969) J.Physiol.(Paris), 61,169-183

EXTON,J.M., ROBISON,G.A., SUTHERLAND,E.W., PARK,C.R.

Studies on the role of adenosine 3'5' monophosphate in the hepatic actions of glucagon and catecholamines.

(1971) J.Biol.Chem.,246,6166-6177

FAIN,J.N.

Effect of dibutyryl 3'5'AMP,theophylline and norepinephrine on lipolytic action of G.H. and glucocorticoid in white fat cells.

(1968) Endocrinol.,82,825-830

FARESE,R.V.

Calcium as a mediatior of adrenocorticotrophic hormone action on adrenal protein synthesis.

(1971) Science,173,447-450

FONTAINE,Y.A., SALMON,C.

Méthodes de dosage des adenyl cyclases.

(1971) Colloque de l'INSERM, Lyon 1971, R.MORNEX,J.NUNEZ édit.

FRANCKSON,J.R., DEMS,H.H., BELLENS,R., BASTENIE,P.J.,CORVILLAIN,J., LOEB,H., CONNARD,V.

Effets de l'hormone de croissance humaine sur certains aspects du métabolisme glucidique.

(1961) 4ème Congrès de la Fédération Internationale du diabète.Genève Med. et Hygiène, édit.

FRIEDMANN,M.

Effects of glucagon and cyclic AMP on ion fluxes in the perfused liver

(1972) Biochim.Biophys.Acta,274,214-225

FRIEDMANN,M., PARK,C.R.

Early effects of 3'5'adenosine monophosphate on the fluxes of calcium and potassium in the perfused liver of normal and adrenalectomized rat

(1968) Proc.Nat.Acad.Sci.U.S.A.,61,504-508

GAGLIARDINO,J.J., MARTIN,J.M.

Stimulation of growth hormone secretion in monkeys by adrenalin, pitressin and adenosine 3'5'-cyclic monophosphoric acid.

(1968) Acta Endocrinol.,59,390-396

GARCIA,A., WILLIAMSON,J.R., CAHILL,G.F.

Studies on the perfused rat liver . II- Effect of glucagon on gluconeogenesis.

(1966) Diabetes,15,188-193

GARREN,L.D., NEY, R.L., WARREN,D.

Studies on the role of protein synthesis in the regulation of corticosterone production by adrenocorticotropic hormone in vivo.

(1965) Proc.Nat.Acad.Sci.,U.S.A.,53,1443-1450

GARTHOFF,L.H., FRIEND,B.A., TOBIN, R.B., MEHLMAN,M.A.

The inhibitory effects of theophylline feeding on gluconeogenic enzymes in rat liver.

(1972) Life Sciences, 11,657-661

GILMAN,A.G.

A protein binding assay for adenosine 3'5'cyclic monophosphate.

(1970) Proc.Nat.Acad.Sci.,U.S.A.,67,305-312

GILMAN,A.G., RALL,T.W.

Factor influencing adenosine 3'5'phosphate accumulation in bovine thyroid slices.

(1968a)J.Biol.Chem.,243,5867-5871

GILMAN,A.G., RALL,T.W.

The role of adenosine 3'5'-phosphate in mediating effect of thyroid-stimulation hormone on carbohydrate metabolism of bovine thyroid slices.
(1968) J.Biol.Chem.,243,5872-5881

GOLD,H., SPECTOR,S., SAMAAN,M.A., PEARSON,O.H.

Effect of growth hormone on the carbohydrate metabolism in hypopituitary dwarfs.

(1968) Metabolism,17,74-83

GOLDBERG,N.D.,VILLAR-PALASI,C., SASKO,M., LARNER,J.

Effects of insulin treatment on muscle 3'5' cyclic adenylate levels in vivo and in vitro.

(1967) Biochim.Biophys.Acta,148,665-672

GOLDBERG,N.D., LARNER,J., SASKO,M.

Enzymic analysis of cyclic 3'5'-AMP in mammalian tissues and urine.
(1969) Analyt.Biochem.,28,523-544

GOODMAN,H.M.

Effects of chronic growth hormone treatment on lipogenesis in rat adipose tissue.
(1963) Endocrinol.,72,95-99

Early and late of effects of G.H.on the metabolism of glucose in adipose tissue.
(1965a) Endocrinol.,76,1134-1140

In vitro actions of G.H.on glucose metabolism in adipose tissue.
(1965a) Endocrinol.,76,216-225

Effects of growth hormone on the penetration of L.arabinose in adipose tissue.
(1966) Endocrinol.,78,819-825

A comparative study of the effects of insuline and STH on hexose metabolism in adipose tissue.
(1967a) Endocrinol.,80,45-51

Effects of growth hormone on glucose utilization in diaphragm muscle in the absence of increased lipolysis.
(1967b) Endocrinol.,81,1099-1107

Multiple effects of growth hormone on lipolysis.
(1968a)Endocrinol.,83 ,300-313

Effects of growth hormone on the lipolytic response of a adipose tissue to theophylline.
(1968b) Endocrinol.,82,1027-1034

G.H. and the metabolism of carbohydrate and lipid in adipose tissue.
(1968c) Am.N.Y.Acad.Sci.,148,418-441

Effects of growth hormone on isolated adipose tissue.
(1968d) in Growth Hormone,153-171

GOODMAN,H.M.

The effects of insulin on lipolysis evoked by cyclic AMP and its dibutyryl analog.

(1969a) Proc.Soc.Exp.Biol.Med.,130,97-100

The effects of epinephrine on glycerol. Production in segments of adipose tissue preincubated with dexamethasone and G.H.

(1969b) Proc.Soc.Exp.Biol.Med.,130,909-912

Metabolic effects of imidazole in adipose tissue.

(1969c) Biochim.Biophys.Acta,176,60-65

GOODMAN,H.M., MACDONALD,G.J.

The effects of hypophysectomy and G.H. on the metabolism of adipose tissue of diabetic rats.

(1969) Horm.Metab.Res.,1,290-295

GOULD,M.K., CHAUDRY,I.H.

The action of insulin on glucose uptake by isolated rat soleus muscle. I- Effects of cations.

(1970a) Biochim.Biophys.Acta,215,249-258

The action of insulin of glucose uptake by isolated rat soleus muscle. II- Dissociation of a primary effect of insulin from its stimulatory effect.

(1970b) Biochim.Biophys.Acta,215,258-264

GRAHAM-SMITH,D.G., BUTCHER,R.W., NEY,R.L., SUTHERLAND,E.W.

AMPc as a intracellular mediator of the action of ACTH in the adrenal cortec.

(1967) J.Biol.Chem.,242,5535-5541

GRUHNER,K., SEGAL,H.L.

Effects of glucose and inhibitors of protein synthesis on the liver glycogen synthetase-activating system.

(1970), Biochim.Biophys.Acta,222,508-514

HAGEN,J.H.

Effect of glucagon on the metabolism of adipose tissue.

(1961) J.Biol.Chem.,236,1023-1027

HANDLER,J.S., BENSINGER,R., ORLOFF,J.

Effect of adrenergic agents on toad bladeler response to ADH, 3'5'-AMP and theophylline.

(1968) Am.J.Physiol.,215,1024-1031

HECHTERMANS,R.

Mécanisme d'action de l'hormone de croissance.

(1970) in Mecanismes d'actions intracellulaires des hormones Masson et Cie, ed.,Paris, pp.209-222

HENDERSON,M.J., MORGAN,H.E., PARK,C.R.

Regulation of glucose uptake in muscle. V- The effects of growth hormone on glucose transport in the isolated perfused rat heart.

(1961) J.Biol.Chem.,236,2157-2161

HENION,W.F., SUTHERLAND,E.W., POSTERNAK,T.H.

Effects of derivatives of AMPc on liver slices and intact animals.

(1967) Biochim.Biophys.Acta,148,106-113

HELLMAN,B., SEHLIN,J., TALJEDAL,I.B.

Evidence for mediated transport of glucose in mammalian pancreatic β cells.

(1971) Biochim.Biophys.Acta,241,147-152

HEPP,D., MENAHAN,L.A., WIELAND,O.

On the role of 3'5' cyclic AMP phosphodiesterase in insulin action on rat liver and adipose tissue.

(1969) Hormone and Metab.Res.,1,93-95

HEPP,K.D., EDEL,R., WIELAND,O.

Hormone action on liver adenylcyclase activity. The effects of glucagon and fluoride on a particulatepreparation from rat and mouse liver.

(1970a),Europ.J.Biochem.,7,171-177

HEPP,K.D., MENAHAN,L.A., WIELAND,O.

3'5'-nucleotide phosphodiesterase activity in fat cells and its role in antililpolysis induced by insulin.

(1970b) Diabetologia,6,48

HERMIER,C., JUTISZ,M.

Biosynthèse de la progestérone in vitro dans le corps jaune de la ratte pseudogestante : influence du Ca++ et du Mg++ sur les effets stimulants dûs à l'hormone lutéinisante, à l'adénosine 3'5' monophosphate cyclique ou à un accroissement de la concentration en potassium.

(1969) Biochim.Biophys.Acta,192,96-105

HJALMARSON,A.

Sensitivity of the rat diaphragm to G-H. III- Biphasic action of G-H *in vitro* on amino-acid and pentose uptake.

(1968a),Acta Endocrinol.,supp^{t} 126,1-17

Analysis of the biphasic action of G-H *in vitro* on the rat diaphragm.

(1968b) Acta Endocrinol.,supp^{t} 126,18-33

Temporal relationship of the G.H.effects on A.A transport and protein synthesis in isolated rat diaphragm.

(1968c) Acta Endocrinol.,supp^{t} 126,37-47

Influence of G-H on the sensitivity of rat diaphragm to insulin.

(1968d) Acta Endocrinol.,supp^{t} 126,49-60

HJALMARSON,A., AHREN,K.

Sensitivity of the rat diaphragm to growth hormone. II- Early and late effects of growth hormone on aminoacid and pentose uptake.

(1967a) Acta Endocrinol., 56,347-358

HJALMARSON,A., AHREN,K.

Stimulatory and inhibitory effects of G-H in the isolated rat diaphragm.

(1967b) Life Science,6,809-815

HJALMARSON,A., ISAKSSON,O., AHREN,K.

Effects of G-H and insulin on aminoacid transport in perfused rat heart.

(1969) Am.J.Physiol.,217,1795-1803

HO,R.J., JEANRENAUD,B.

Insulin-like action of ouabain. Effect on carbohydrate metabolism.

(1967a) Biochim.Biophys.Acta,144,61-73

HO,R.J., JEANRENAUD,B., POSTERNAK,T., RENOLD,A.E.

Insulin-like action of ouabain. II- Primary antilipolytic effect through inhibition of adenylcyclase.

(1967b) Biochim.Biophys.Acta,144,74-82

HOUSSAY,B.A., BIASOTTI,A.

Les troubles diabétiques chez le chien privé d'hypophyse et de pancréas.

(1930) C.R.Soc.Biol.,105,124-126

HOUSSAY,B.A., RODRIGUES,R.R.

Diabetogenic action of different preparations of G-H.

(1953) Endocrinol.,53,114-116

ILLIANO,G., CUATRECASAS,P.

Glucose transport in fat cell membranes.

(1971) J.Biol.Chem.,246,2472-2479

INGLE,D., NEZAMIS,J.E., HUMPHREX,L.M.

Absence of hyperglycemic effect of glucagon in the eviscerate rat.

(1953) Proc.Soc.Exp.Biol.,84,232-233

JEFFERSON,L.S., EXTON,J.H., BUTCHER,R.W., SUTHERLAND,E.W., PARK,C.R.

Role of AMPc in the effects of insuline and anti-serum on liver metabolism.

(1968) J.Biol.Chem.,243,1031-1038

JOHNSON,R.A., HARDMAN,J.G., BROADUS,A.E., SUTHERLAND,E.W.

Analysis of adenosine 3'5'-monophosphate with luciferase luminescence.

(1970) Anal.Biochem.,35,91-97

JOST,J.P., RICKENBERG,H.V.

Cyclic AMPc

(1971) Annual Rev.Biochem.,40,741-774

JUNGAS,R.L.

Role of cyclic 3'5'AMP in the response of adipose tissue to insulin.

(1966) Proc.Nat.Acad.Sci.,56,757-763

JURKOWITZ,L., HACKEL,R.

The effect of insulin on xylose uptake by the intact hemidiaphragm of hypophysectomized rat.

(1971) Proc.Sci.Exp.Biol.Med.,138,993-994

KAKIUCHI,S., RALL,T.W.

The effect of electrical stimulation upon the accumulation of adenosine 3'5'-phosphate in isolated cerebral tissue.

(1969) J.Neurochem.,16,485-491

KAKIUCHI,S., YAMAZAKI,R.

Stimulation of the activity of cyclic 3'5'nucleotide phosphodiesterase by calcium ion.

(1970a) Proc.Jap.Acad.,46,387-392

KAKIUCHI,S., YAMAZAKI,R., NAKAJIMA,H.

Properties of a heat-stable phosphodiesterase activating factor isolated from brain extract.

(1970b) Proc.Jap.Acad.,46,587-592

KITABCHI,A.E., SOLOMON,S.S., BRUSH,J.S.

The insulin-like activity of cyclic nucleotides and their inhibition by caffeine on the isolated fat cells.

(1970) Biochem.Biophys.Res.Comm.,39,1065-1072

KLEISBAUER,J.P., TRINER,L., NAHAS,G.G.

Effets des dérivés de l'imidazole sur la lipolyse in vitro à pH 7,4 et 6,6.

(1968) C.R.Acad.Sci.,267,541-544

KNIPIS,D.M., CORI,C.F.

The effect of insuline on pentose uptake by the diaphragm.

(1967) J.Biol.Chem.,224,681-684

KOHN,P.G., CLAUSEN,T.

The relationship between the transport of glucose and cations across cells membranes in isolated tissues. VI- The effect of insulin, ouabain and metabolic inhibitors on the transport of 3-O methylglucose and glucose in rat soleus muscles.

(1971) Biochim.Biophys.Acta,225,277-290

KONIJN,T.M.

Microbiological assay of cyclic 3'5'-AMP.

(1970) Experientia,26,367-369

KRAHL,M.E., PARK,C.R.

The uptake of glucose by the isolated diaphragm of normal and hypophysectomized rats.

(1948) J.Biol.Chem.,174,939-946

KRISHNA,G., WEISS,B., BRODIE,B.B.

A simple, sensitive method for the assay of adenylcyclase.

(1968) J.Pharmacol.exp.Therap.,163,379-385

KRISHNA,G., BIRNBAUMER,L.

On the assay of adenylcyclase.

(1970) Anal.Biochem.,35,393-398

KUKOVETZ,W.R., POECH,G.

The action of imidazole on the effects of methylxanthines and catecholamines on cardiac concentration and phosphorylase activity.

(1967) J.Pharmacol.Exp.Ther.,156,514-521

KUO,J.F., De RENZO,E.C.

A comparison of the effects of lipolytic and antilipolytic agents on adenosine 3'5'monophosphate levels in adipose cells as determined by prior labelling with adenine 8 ^{14}C.

(1969) J.Biol.Chem.,244,2252-2278

KUO,J.F.

Differential effects of Ca^{++} EDTA and adrenergic blocking agents on the action of some hormones on adenosine 3'5' monophosphate levels in isolated adipose cells as determinated by prior labelling with (8 ^{14}C) adenine.

(1970) Biochim.Biophys.Acta,207,509-516

KURTZ,M., DEBODO,R.C., KIANG,S.P., ANCOWITZ,A.

Hypoglycemia produced by purified anterior pituitary G-H and its relationship to the pancreas.

(1951) Proc.Soc.exp.Biol.Med.,76,21-24

LEFEBVRE,P.

Effets du glucagon sur la captation du glucose par l'arrière-train isolé du chien.

(1963) Path.Biol.,11,890-894

LEFKOWITZ,R.J., ROTH,J., PASTAN,I.

Localization of effect of calcium on ACTH action.

(1970) Nature,228,864-866

LETARTE,J., RENOLD,A.E.

Ionic effects on glucose transport and metabolism by isolated mouse fat cells incubated with or without insulin. I- Lack of effect of medium Ca^{++},Mg^{++} or PO_4^{3-}.

(1969a) Biochim.Biophys.Acta,183,350-356

LETARTE,J., JEANRENAUD,B., RENOLD,A.E.

Ionic effects on glucose transport and metabolism by isolated mouse fat cells incubated with or without insulin. II- Effect of replacement of K^+ and ouabain.

(1969b) Biochim.Biophys.Acta,183,356-365

LETARTE,J., RENOLD,A.E.

Ionic effects on glucose transport and metabolism by isolated mouse fat cells incubated with or without insulin. III- Effects of replacement of Na^+.

(1969c) Biochim.Biophys.Acta,183,366-374

LEVEY,G.S., EPSTEIN,S.E.

Activation of adenylcyclase by glucagon in cat and human heart.

(1969) Circulation Research,24,151-157

LEVY,J., Michel BER E.

Sur l'hyperglycémie provoquée in vivo chez le rat et le lapin par les associations bases xanthiques-AMP cyclique.

(1969) Thérapie,24,937-938

LIEBECQ,C.

Influence des détergents et du calcium sur la consommation du glucose par le diaphragme isolé du rat.

(1962) Biochim.Biophys.Acta,65,534-535

LUNDHOLM,L., RALL,T., VAMOS,N.

Influence of K-ions and adrenaline on the adenosine-3'5'monophosphate content in rat diaphragm.

(1967) Acta Physiol.Scand.,70,127-128

MAC MANUS,J.P., WHITFIELD,J.F.

Mediation of the mitogenic action of growth hormone by adenosine 3'5' monophosphate (cyclic AMP).

(1969) Proc.Soc.exp.Biol.Med.,132,409-411

MAHLER,R.J., SZABO,O.

The acute insulin synergistic activity of growth hormone. I- Inhibition by chronic G-H administration.

(1969) Hormone Metab.Res.,1,26-32

MANGANIELLO,V., MURAD,F., VAUGHAN,M.

Effects of lipolytic and antilipolytic agents on cyclic 3'5'adenosine monophosphate in fat cells.

(1971) J.Biol.Chem.,246,2195-2202

MOREL,F.

L'adénosine monophosphate cyclique, médiateur intracellulaire de l'action de nombreuses hormones.

(1970) Triangle,10,57-64

MORGAN,M.E., REGEN,D.M., HENDERSON,M.J., SAWYER,T.R., PARK,C.R.

Regulation of glucose uptake in muscle.

(1961) J.Biol.Chem.,236, 2162-2168

MOSINGER,B., VAUGHAN,M.

Effects of electrolytes on epinephrine stimulated lipolysis in adipose tissue in vitro.

(1967a) Biochem.Biophys.Acta,144,556-568

MOSINGER,B., VAUGHAN,M.

The action of AMPc on lipolysis in rat adipose tissue.

(1967) Biochim.Biophys.Acta,144,569-582

MOSKOWITZ,J., FAIN,J.N.

Stimulation by growth hormone and dexamethanose of labeled cyclic adenosine 3'5'-monophosphate accumulation by white fat cells.

(1970) J.Biol.Chem.,245,1101-1107

MUELLER,E.E., PECILE,A., MAIMZADA,M.K., FERRARIO,G.

The involvement of cyclic 3'5'-adenosine monophosphate in the growth hormone release mechanism.

(1969) Experientia,25,750-751

MULLER-OERLINGHAUSEN,B.,SCHWABE V.,HASSELBLATT,A., SCHMIDT,F.M.

Activity of 3,5'AMP phosphodiesterase in liver and adipose tissue of normal and diabetic rats.

(1968) Life Science,7,593-598

NAKANO,J., OLIVER,R., ISHII,T.

Effect of imidazole and its derivatives on norepinenephrine-,ACTH-, theophylline- and dibutyryl cyclic AMP-induced lipolysis in isolated rat fat cells.

(1970) Pharmacol.,3,273-281

NAMM,D.H., MAYER,S.E., MALTBIE,M.

The role of potassium and calcium ions in the effect of epinenephrine on cardiac cyclic adenosine 3'5'-monophosphate, phosphorylase kinase, and phosphorylase.

(1968) Mol.Pharmacol.,4,522-530

NORTHROP,G., PARK,R.E.

3'5'AMP induced hyperglycemic in intact rats and in the isolated perfused rat liver.

(1964) Biochem.Pharmacol.,13,120-123

OTTAWAY,J.H.

Action of growth hormone on isolated rat diaphragm.

(1951) Nature,167,1064-1065

ØYE,I., SUTHERLAND,E.W.

Effect of epinephrine and other agents on adenylcyclase in the cell membrane of avian erythrocytes.

(1966) Biochem.Biophys.Acta,127,347-354

PARK, C.R., BROWN,D.H., CORNBLATH,M., DAUGHADAY W.

The effect of growth hormone on glucose uptake by the isolated rat diaphragm.

(1952) J.Biol.Chem.,197,151-166

PARK,C.R., CROFFORD,O.B., KONO,T.

Mediated (non active) transport of glucose in mammalian cells and its regulation.

(1968) J.Gen.Physiol.,52, 296 s-318 s

PAUK,G.L., REDDY,W.J.

Measurement of adenosine 3'5'-monophosphate.

(1967) Analyt.Biochem.,21,298-303

PAYNE,S.G., KOSTYO,J.L.

Inhibition by theophylline of the stimulatory effects of growth hormone on amino-acid transport and protein synthesis in muscle.

(1970) Endoc.,87,1186-1191

PETERKOFSKY,A., GAZDAR,C.

Glucose and the metabolism of adenosine 3'5'cyclic monophosphate in Escherichia coli.

(1971) Proc.Nat.Acad.Sci.,U.S.A.,68,2794-2798

PISAREV,M.A., DEGROOT,L.J., MATI,R.

KI and imidazole inhibition of TSH and C AMP induced thyroidal iodine secretion.

(1971) Endoc.,88,1217-1221

POSNER,J.B., HAMMERMEISTER,K.E., BRATVOLD,G.E., KREBS,E.G.

The assay of adenosine 3'5'-phosphate in skeletal muscle.

(1964),Biochemistry,3,1040-1044

POSTERNAK,T., SUTHERLAND,E.W., HENION,W.F.

Derivatives of cyclic 3'5'-adenosine-monophosphate.

(1962) Biochim.Biophys.Acta,65,558-560

PRADET,A.

Etude des adénosine 5'mono di et tri phosphates dans les tissus végétaux. I- Dosage enzymatique.

(1967) Physiol.Veget.,5,209-221

PRELOT,M., DURAND,D., BELDON,H.

Effets chroniques des hormones somatotrope, thyréotrope et de la thyroxine sur le métabolisme phosphocalcique de la ratte normale et thyroparathyroïdectomisée.

(1971) J.Physiol.(Paris),63,705-713

RABINOVITZ,M., DESALLES,L., MEISLER,J., LORAND,L.

Distribution of adenyl cyclase activity in rabbit skeletal muscle fractions.

(1965) Biochim.Biophys.Acta,97,29-36

RALL,T.W., SUTHERLAND,E.W.

Formation of a cyclic adenine ribonucleotide by tissue particules.

(1958) J.Biol.Chem.,232,1065-1076

RALL,T.W., SUTHERLAND,E.W.

Adenylcyclase. II- The enzymatically catalyzed formation of adenosine 3'5'phosphate and inorganic pyrophosphate from adenosine triphosphate.

(1962) J.Biol.Chem.,237,1228-1232

RANDLE,P.J.

The interrelationship of hormones fatty acids and glucose in the provision of energy.

(1964) Postgrad Med.J.,40,457-463

RANDLE,P.J., MORGAN,H.E.

Regulation of glucose uptake by muscle.

(1962) Vitam.Horm.,20,199-249

RASMUSSEN,H.

Cell communication calcium ion and cyclic adenosine monophosphate.

(1970) Science,170,404-412

RASMUSSEN,H.,PECHET,M.,FAST D.,

Effect of dibutyryl cyclic adenosine 3'5'-monophosphate, theophylline, and other nucleotides upon calcium and phosphate metabolism.

(1968) J.Clin.Invest.,47,1843-1850

RASMUSSEN,H., TENENHOUSE,A.

Cyclic adenosine monophosphate, Ca^{++} and membranes.

(1968) Proc.Nat.Acad.Sci.,U.S.A.,59,1364-1370

RASMUSSEN,H., NAGATA,N.

Renal gluconeogenesis effect of Ca^{++} and H^{+}.

(1970a) Biochim.Biophys.Acta,215,1-17

RASMUSSEN,H., NAGATA,N.

Renal gluconeogenesis effect of parathyroid hormone and dibutyryl 3'5'AMP.

(1970b) Biochim.Biophys.Acta, 215,18-29

REEDIJK,J.

Pyrazoles and imidazoles as ligands. Part.I- Some simple metal (11) perchlorates and tetrafluoroborates solvated by neutral pyrazole.

(1969a) Recueil des travaux chimiques,P.B.,88,1451-1470

Pyrazoles and imidazoles as ligands. II- Coordination compounds.

(1969b) Inorganica chimica Acta,3,517-522

Pyrazoles and imidazoles as ligands. VI- Coordination compounds of metal II perchlorates tetrafluoroborates and nitrates containing the ligand Nn butyl imidazoles.

(1971) J.Inorg. Unud Chem.,33,179-188

REEDIJK,J., WINDHORST,J.C.A., VANHAM,N.H.M., GROENEVELD,W.L.

Pyrazoles and imidazoles as ligands. Part IX- Some adducts formed between Ca (II) salts and substituted pyrazoles.

(1971) Recueil des travaux chimiques des Pays-Bas,90,234-251

RIDDICK,F.A., REISLER,D.M., KIPNIS,D.M.

The sugar transport in striated muscle, effect of growth hormone hydrocortisone and alloxan diabetes.

(1962) Diabetes,11,171-178

RILLEMA,J.A., KOSTYO,J.L.

Studies on the delayed action of growth hormone on the metabolism of rat diaphragm.

(1971) Endocrinol.,88,240-248

ROBISON,A.G., BUTCHER,R.W., SUTHERLAND,E.W.

Adenyl cyclase as an adrenergic receptor.

(1967) Ann.N.Y.Acad.Sci.,139,703-723

ROBISON,A.G., BUTCHER,R.W., SUTHERLAND,E.W.

Cyclic AMP.

(1968) Ann.Rev.Biochem.,37,149-170

ROBISON,A.G., BUTCHER,R.W., SUTHERLAND,E.W.

Cyclic AMP.

(1971) Academic Press ed. New York and London.

RODBELL,M.

Metabolism of isolated fat cells. V- Preparation of "ghost" and their properties, adenyl cyclase and other enzymes.

(1967a) J.Biol.Chem.,242,5744-5750

Metabolism of isolated fat cells. The effects of insulin, lypolytic hormones and theophylline on glucose transport and metabolism in ghosts.

(1967b) J.Biol.Chem., 242,5751-5756

SCHALCH,D.S., REICHLIN,S.

Plasma growth hormone concentration in the rat determined by radio-immunoassay : influence of sex pragnancy, lactation, anesthesia, hypophysectomy, and extrasellar pituitary transplants.

(1966) Endocrinol.,79,275-280

SCHIMMEL,R.J., GOODMAN,H.M.

Effects of dibutyryl cyclic adenosine 3'5' monophosphate on glucose transport and metabolism in rat adipose tissue.

(1971) Biochim.Biophys.Acta,239,9-15

SEIFTER,S., SEYMOUR,D., NOVIC,D., MUNTWYLER,E.

The estimation of glycogen with the anthrone reagent.

(1950)Archic.Biochem.,25,191-200

SHIMIZU,H., DALY,J.W., CREVELING,C.R.

A radioisotopic method for measuring the formation of adenosine 3'5' cyclic monophosphate in incubated slices of brain.

(1969),J.Neurochem.,16,1609-1616

SIOUFI,A., PERCHERON,F., COURTOIS,J.E.

AMP cyclique.

(1970) Path.Biol.,18,79-95

SMYTHIES,J.

The adenylcyclase complex, a model of its mechanism of action in relation to the α and β adrenergic receptors.

(1972) Europ.J.Pharmacol.,19,18-24

SUTHERLAND,E.W., RALL,T.W.

Fractionation and characterization of cyclic adenine ribonucleotide formed by tissue particules.

(1958) J.Biol.Chem., 232,1077-1091

SUTHERLAND,E.W., RALL,T.W.

The relation of adenosine-3'5'-phosphate and phosphorylase to the action of catecholamines and other hormones.

(1960) Pharmacol.Rev.,12,265-299

SUTHERLAND,E.W., RALL,T.W., MENON T.

Adenylcyclase. I- Distribution preparations and properties.

(1962) J.Biol.Chem.,237,1220-1227

SUTHERLAND,E.W., ROBISON,G., BUTCHER,R.W.

Some aspects of the biological role od adenosine 3'5'monophosphate (cyclic AMP).

(1968) Circulation,37,279-301

SUTHERLAND,E.W., RALL,T.W.

The relation of adenosine 3'5' phosphate and phosphorylase to the action of catecholamines and other hormones.

(1969) Pharmcol.Rev.,12,265-299

SUTHERLAND,E.W., ROBISON,G.A.

The role of cyclic AMP in the control of carbohydrate metabolism.

(1969) Diabetes,18,797-819

STANLEY,P.E.

Determination of subpicomole levels of NADH and FMN using bacterial luciferase and the liq scintillation spectrometer.

(1971) Anal.Biochem.,39,441-453

STEIN,W.D.

The transport of sugars.

(1968) Bristish Med.Bull.,24,146-149

SWISLOCKI,N.I.

Dissociation of lypolysis and protein anabolism by ACTH, bovine growth hormone and thyroid stimulating hormone, in adipose tissue with dibutyryl cyclic AMP and theophylline.

(1970) Biochim.Biophys.Acta,201,242-249

SWISLOCKI,N.J., SZEGO,C.M.

Acute reduction of plasma non esterified fatty acid by growth hormone in hypophysectomized and Houssay rats.

(1965) Endocrinol.,76,665-672

TENENHOUSE,A., RASMUSSEN,H., NAGATA,N.

Parathyroid hormone 3'5'AMP and Ca^{++}.

(1969) in Calcitonin, Heinemann edit.,Londres 418-426

TURTLE,J.R., KIPNIS,D.M.

An adrenergic receptor mechanism for the control of cyclic 3'5'AMP synthesis in tissues.

(1967a) Biochem.Biophys.Res.Comm.,28,797-802

TURTLE,J.R., LITTLETON,G.K., KIPNIS,D.M.

Stimulation of insulin secretion by theophylline.

(1967b) Nature,213,727-728

VAN ITALLIE,T.B., MORGAN,M.C., DOTTI,L.B.

Effect of glucagon on peripheral utilization of glucose in man.

(1955)J.Clin.Endocr.,15,28-35

WADE,D.R., CHALMERS,T.N., HALES,C.N.

The effects of Mg^{++}, Ca^{++}, ATP and cyclic 3'5'AMP on the hormone sensitive lipase of adipose tissue.

(1970) Biochim.Biophys.Acta,218,496-507

WAI YIU CHEUNG

Cyclic 3'5'nucleotide phosphodiesterase effect of divalent cations.

(1971) Biochim.Biophys.Acta,242,395-409

WARREN,D., GARREN,L.D.

On the mechanism of action of ACTH. The inhibitory site of cycloheximide in the pathway of steroid biosynthesis.

(1968) J.Biol.Chem.,243,5153

WELLS,H., LLOYD,W.

Hypocalcemic effect of imidazole in rats.

(1968) Endocrinol.,83,521-529

WHITFIELD,J.F., Mac MANUS,J.P., FRANKS,D.J., GILLAN,D.J., YOUDALE,T.

The possible mediation by cyclic AMP of the stimulation of Thymocyte proliferation by cyclic GMP.

(1971) Proc.Soc.exp.Biol.Med.,137,453-457

WHITNEY,J.E., KNOTT,M.M., DOBBS,R.E.

Effect of growth hormone and glucose on C^{14} incorporation by the perfused dog pancreas.

(1968) Proc.Soc.exp.Biol.Med.,128,488-490

WILKENFELD,B.E., LEVY,B.

The effects of theophylline, diazoxide and imidazole on isoproterenol induced inhibition on the rabbit ileum.

(1969) J.Pharmol.,169,61-67

WOOL,I.G.

Incorporation of C^{14} from C^{14} labeled sugars into CO_2, nucleic acids and protein by isolated rat diaphragm.

(1960) Am.J.Physiol.,198,649-651

YOUNG,F.G.

Insulin and the action of growth hormone.

(1968) Excerpta Med.Int.Cong.Ser.Pays-Bas,158,139-142

YU,B.P., MASORO,E.J., DE MARTINIS,F.D.

Imidazole and sequestration of calcium ions by sarcoplasmic reticulum.

(1967) Nature,London, 216,822-824

ZOR,U., LOWE,J.P., BLOOM,G., FIELD,J.B.

The role of calcium (Ca^{++}) in TSH and dibutyryl 3'5'-cyclic AMP stimulation of thyroid glucose oxidation and phospholipid synthesis.

(1968) Biochem.Biophys.Res.Comm.,33,649-658